وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
جامعة بابل
كلية العلوم / قسم علوم الحياة

أساسيات
في علم المناعة العملي
لطلبة كليات العلوم / قسم علوم الحياة



الأستاذ الدكتور
علاء جواد حسن

الأستاذ الدكتور
فريال جميل عبد

المدرس
أنمار مهدي كاظم

2025

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

جامعة بابل

كلية العلوم / قسم علوم الحياة

أساسيات
في علم المناعة العملي
لطلبة كليات العلوم / قسم علوم الحياة

الأستاذ الدكتور

علاء جواد حسن

الأستاذ الدكتور

فريال جميل عبد

المدرس

أنمار مهدي كاظم

2025

900/ 123
أساسيات في علم المناعة العملي
لطلبة كليات العلوم / قسم علوم الحياة
أ.د. علاء جواد حسن / أ.د. فريال جميل عبد / م. أنمار مهدي كاظم
العراق/ بابل: دار الفرات للثقافة والاعلام، 2025
07707311570/ ali.abs505@yahoo.com

م/ و
1383/ 2023

رقم الإيداع في دار الكتب والوثائق ببغداد (1383) لسنة 2025

أساسيات في علم المناعة العملي

لطلبة كليات العلوم / قسم علوم الحياة

أ.د. علاء جواد حسن / أ.د. فريال جميل عبد / م. أنمار مهدي كاظم

دار الفرات للثقافة والإعلام – بابل – العراق 2025

بالاشتراك مع دار سما للطبع والنشر والتوزيع

Al-Furat House for Education and Information

Iraq – Babylon

المحتويات

المقدمة

يعتبر علم المناعة من أكثر العلوم شيوعا" والأكثر بريقا" مقارنة مع العلوم البيولوجية الأخرى، ونعتقد أن هنالك زيادة كبيرة في عدد العاملين في هذا الحقل خلال العقدين الماضيين أكثر من أيّ تخصص علمي آخر.

إن علم المناعة علم قائم بذاته، و إن المتحمسين للعمل في هذا الحقل من العلوم ، و مؤلفي هذا الكتاب يكون حماسهم موجهًا بشكل أساسي لفهم التطبيقات المناعية في الإنسان ، و التجارب على الحيوانات المختبرية.

إنّ التجارب والاختبارات في هذا الكتاب تقدم لنا فهما" حقيقيا" لشكل واستراتيجية عملية الحياة، وبفضل القدرة على التعرف على خلايا الجهاز المناعي ، الجزيئيات، الأضداد، و المستضدات ، فيمكن تطبيق التقنيات الجديدة في علم المناعة ، والذي يعتبر أساسيا" في حماية جسم الكائن الحيّ وديمومة وظائفه الأساسية.

هذا الكتاب هو في الأساس مقدمة بسيطة الى التقنيات والأفكار التي يعتمد عليها في علم المناعة العملي ، ولهذا فان التعامل مع معظم التجارب المذكورة في متن الكتاب والتي غالبا" ما تكون بسيطة تقع على عاتق القائم بالتجربة .نرجو أن نكون قد وفرنا مصدرا" متواضعا" بالمعلومات العلمية العملية لأبنائنا الطلبة. والله الموفق ..

المؤلفون/ 2025

طبيعة مختبر علم المناعة

يجري في مختبر علم المناعة التعامل مع الدم البشري او الحيواني ، اذ يشمل هذا التعامل خلط الدم (المصل او البلازما) الذي تتواجد فيه عناصر المناعه الخلطيه الغير متخصصه (الكلوبيولينات ، المتمم بمساريه البديل واللكتيني و بروتينات الطور الحاد) و المتخصصه (كالأضداد والمتمم بمساره التقليدي)، وكذلك الامر مع المكونات الخلوية للدم كالخلايا اللمفية و الخلايا الملتهمة.

1-استحصال الامصال و حفظها و ازالة المتمم:

ان الهدف من هذة التجربة هو التعرف على :

أ-كيفية استحصال الدم و فصل الامصال.

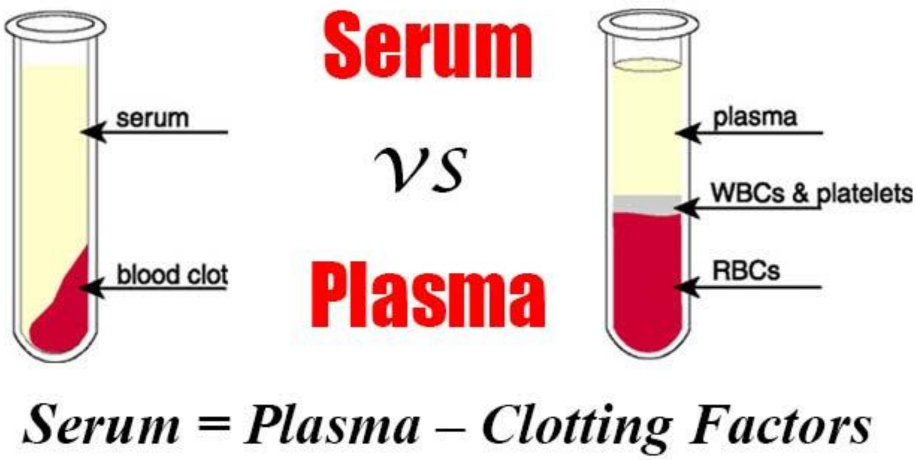
ب- كيفية حفظ الامصال .

ت- كيفية ازالة المتمم.

2- الاساس العلمي:

الدم هو عبارة عن نسيج ضام يتألف من كريات الدم الحمر ، خلايا الدم البيض و الصفيحات الدموية و كلها مختلطه مع البلازما التي هي سائل اصفر باهت. يعتبر الدم ضروري جدا لكثير من الكائنات الحية مثل الإنسان وبقية الحيوانات، وذلك لوظيفته المهمة في نقل المواد (الغذاء والأكسجين) والفيتامينات والفضلات (ثاني أكسيد الكربون) والهرمونات وغيرها إلى جميع أنسجة وخلايا الجسم. يكون الدم في جسم اللبائن سائل ودرجة حرارته الطبيعية

هي 37 درجة مئوية و يبقى كذلك و لكن عند سحبه من الجسم بغياب موانع التخثر فانه يتخثر نتيجة لاحتجاز كريات الدم الحمر من قبل مشبكات الليفين ليبقى سائل شبه شفاف باهت اللون يطلق عليه اسم المصل ، ولذلك المصل= بلازما – موانع التخثر ، وكما هو موضح في الشكل (1).



الشكل(1):الفرق بين المصل والبلازما .

3- الادوات و المواد المستخدمة :

أ- ماء الملح الوظيفي.

ب- محاقن طبية نبيذة.

ت- محلول ازايد الصوديوم او مرثايوليت.

ث- وحدة ترشيح غشائي من نوع المحقنة حيث يكون قطر منافذه 0.45μ .

ج- انابيب حفظ الامصال .

ح- حمام مائي.

4- طريقة العمل:

أ- سحب الدم:

يتم سحب الدم من الانسان باستخدام الرباط الضاغط (Tornica) على الوريد العضدي ، حيث تسحب كميه منه بواسطة محقنة ، كذلك يمكن سحب الدم من اوردة الرسغ في اليدين ، اما في الاطفال فيكون السحب من الوريد الوداجي في الرقبه وكذلك من الوريد الرئيس في المرفق العاني الاربي.

يتم سحب الدم في حيوان المزرعة من الوريد الوداجي في رقبة الحيوان او اثناء الذبح من الرقبة، أما بالنسبة الى الحيوان المختبري فيتم سحب الدم بثقب القلب، أو أثناء التشريح ،أو من وريد الذنب بعد قطعه من الفأر (بشكل خاص) ومن الوريد الوسطي الاذني من الارنب او الجرذ.

ب- فصل المصل:

يجمع الدم في آنيه زجاجية فيها حب الزجاج او مانع تخثر(مثل الهيبارين أو EDTA)لاجل الحصول على بلازما، أما في حالة الرغبة بالحصول على المصل فيجمع الدم في انابيب نظيفة معقمة خاليه من حب الزجاج او مانع التخثر حيث يترك لمدة نصف ساعة بدرجة حرارة الغرفة و بعدها يوضع في الثلاجة لمدة 45 دقيقة ،وبعد اكتمال التخثر تزال الخثرة من جدران الانبوبة و ينبذ في جهاز الطرد المركزي بسرعة 2500 دورة/ الدقيقة لمدة 10 دقائق ثم يجمع المصل.

ت- حفظ الامصال:

يتم امرار الامصال المستحصل عليها اعلاه عبر وحدة الترشيح الغشائي من

نوع المحقنة و توزع بكميات 0.25 ml في أنابيب ابندروف (الشكل2)وتحفظ بالتجميد في $-18 \ C^\circ$ ، وكذلك يمكن حفظ الامصال عن طريق اضافة مواد كيميائية حافظة مثل ازايد الصوديوم بحيث يكون التركيز الكلي 0.001% و بأحجام 0.02 ml في انابيب بولي اثلين ذات سدادات محكمة.



الشكل(2): أنابيب ابندروف لحفظ الأمصال .

ث- ازالة المتمم:

يتم ازالة المتمم من خلال وضع الامصال التي تم الحصول عليها في حمام مائي بدرجة حرارة $56 \ C^\circ$ ولمدة نصف ساعة ، و يمكن التأكد من ذلك عن طريق فحص القابلية الحالة للبكتريا او لكريات الدم الحمر قبل وبعد المعاملة.

أخطاء سحب الدم :

توجد العديد من الأخطاء أثناء عملية سحب عينات الدم من الأنسان أو الحيوان والتي تؤثر سلبًا على النتائج، ومن أبرزتلك الأخطاء خلال سحب الدم من الوريد:

1- سحب عينة الدم من المريض أثناء وقوف المريض ، فهذا قد يؤدي إلى

حدوث إغماء وسقوط المريض.

2-وضع الرباط الضاغط في مكان قريب جداً من مكان سحب الدم؛ فهذا يعيق مرور الدم ويحدُّ من المساحة المتاحة لسحب الدم منها.

3-شدِّ الرباط الضاغط بشكلٍ كبير، فهذا أيضاً يزيد من الضغط على الأوردة ويمنع مرور الدم.

4-وضع الرباط الضاغط لمدة تتجاوز الدقيقة قبل سحب الدم، فهذا يؤدي إلى تكسر خلايا الدم وخروج بعض مكونات الخلية إلى البلازما، مما يؤثر على نتائج بعض التحاليل.

5-السحب من مكان قد تم سحب الدم منه خلال العشر ساعات السابقة، أو السحب من مكان به ندبة أو حرق أو جرح.

6-السحب من مكان يأخذ المريض به تغذية وريدية؛ فهذا سيؤثر على نتائج التحاليل.

7-عدم تعقيم مكان سحب الدم بالكحول قبل سحب الدم.

8-عدم الانتظار حتى يجف الكحول من الجلد، فهذا يؤدي إلى تكسر خلايا الدم وتتأثر نتائج التحاليل.

9-لمس مكان السحب باليد بعد التعقيم، فهذا يؤدي إلى تلوث مكان سحب الدم.

10-اتجاه غرز الإبرة ليس في نفس اتجاه الوريد، فهذا يؤدي إلى عدم الوصول الى مكان الوريد، وبالتالي عدم التمكن من سحب الدم.

11-نزع الإبرة قبل فك الرباط الضاغط، فهذا قد يؤدي إلى حدوث تجمع للدم تحت الجلد.

الحيوان المختبري Laboratory Animal

الهدف:

التعرف على مفهوم الحيوان المختبري وفوائده و أنواعه ، حيث يستخدم الحيوان المختبري كموديل يحاكي ما يحدث في المضيف الاصلي من حيث المظاهر الشكلية للاعضاء المختلفة وكذلك المعالجات الحيوية المختلفة أو التغييرات المرضية االناتجة عن العدوى العفوية.

فوائد استخدام الحيوان المختبري :

يعتبر حيوان المختبر مجال خصب لتحقيق العديد من الاهداف الواردة في ادناه (الكل أو البعض منها):

1-التعرف على المظاهر الشكلية للأعضاء المختلفة وكذلك موقعها في جسم الحيوان المختبري ومقارنة ذلك مع مثيلاتها في جسم الأنسان .

2-تنمية بعض الجراثيم التي لا يمكن تنميتها في اوساط صنعية.

3- مصدر الى مكونات المتمم.

4- مصدرالى البلازما .

5-تحضير الامصال الممنعة.

6-مصدر لكريات الدم الحمر المستخدمة في الفحوص المصلية.

7- التحقيق من وقائية لقاح معين تجاه ميكروب محدد.

8-دراسة الأمراضية وتحقيق فرضيات كوخ.

9- دراسة سمية مخلفات الجراثيم و اثر فاعليتها الحيوية(تحديد الجرعة الدنيا القاتلةMLD والجرعة القاتلة لنصف العدد LD_{50}).

10- دراسة مختلف الظواهر المناعية، حيث تعتمد الاستجابة المناعية للحيوانات الممنعة على:

أ-جرعة المستضد Dosage of antigen .

ب-طريقة اعطاء المستضد Route of administration .

ت-نوع الحيوان المختبري Type of laboratory animal .

ث-القابلية الجينية Genetic ability .

انواع الحيوانات المختبرية:

1-يكون الحيوان خالي من جراثيم معينة

Specific pathogen-free animals SPF لدراسة امراض الحيوانات الكبيرة.

2- يكون الحيوان مطهر من كل الجراثيم Gnotobiosis.

خصائص الحيوانات المختبرية:

يجب معرفة العديد من خصائص الحيوان المختبري المراد التعامل معه والمتمثلة بالوزن Weight، العمر Age، الجنس Gender، النقاء الجيني Genetic purity ، وكذلك أن يكون الحيوان غير مصاب أو سليم Healthy.

أسس اختيار الحيوان المختبري :

هنالك العديد من الاسس في أختيار الحيوان المختبري في التجارب وهي:

1-سهولة التداول.

2-توفر متطلبات التربية .

3-صلاحية الحيوان الوراثي للتحري عن ظاهرة معينة قيد الدرس .

4-الكلفة الاقتصادية .

5- طبيعة تداوله من حيث السهولة او الصعوبة.

التعامل مع حيوان المختبر:

لكل حيوان مختبري بيئة خاصة به لذا يجب توفير بيئة ملائمة لكل حيوان مختبري فالفأر الابيض له طريقة تداول تختلف عن طرق تداول الارنب او الجرذ الابيض او الكلب.

البيت الحيواني Animal house:

ضمن التصميم الاساس الى البيت الحيواني يجب ان يتحقق ما يلي:

1-غرفة العدوى يجب أن تكون معزولة عن غرفة التربية.

2-الحيوان القادم حديثا يجب أن تكون له غرفة انتقال ، أي يصبح له تكيف adaptation الى البيت الحيواني .

3-اختبارات دخولية للبيت الحيواني من حيث سلامته من العدوى.

4-يجب أن يكون الشخص المسؤول عن الحيوانات في غرفة العدوى غير الشخص الذي يقوم بالتربية.

5-توفر نظام تدفئة وتبريد ، تهوية وكذلك محرار لقياس درجة الحرارة في غرف التربية والعدوى.

تشريح الحيوان المختبري Laboratory animal dissection

الاساس العلمي:

يتم تشريح الحيوان المختبري لكي تكون هنالك رؤية مباشرة وأصيلة للأعضاء المختلفة ، فاذا كان حيوانا″ لبونا″ كالارنب Rabbit أو الجرذ ratيكون موقع اعضاء جسمة بعد التشريح هي مماثلة لما موجود في جسم الانسان ، اي انه يتيح التعلم المنهجي وفهم الاستقصاء العلمي ، كذلك يوجد تشابه في رد الفعل من قبل انسجة و اعضاء الحيوانات اللبونة مع الانسان ، الذي يؤدي الى تشابه في مسار العملية المرضية في الحيوان المختبري والانسان ، كذلك الحال بالنسبة الى التفاعلات المصلية حيث يوجد بعض التشابه بين طبيعة امصال تلك الحيوانات والانسان باستثناء بعض الخصائص الدقيقة.

أختيار المكان المناسب للتشريح :

من الضروري جدا″ استخدام مكان أو غرفة مناسبة لأجراء التشريح وهذا يتطلب مايلي :

1- يجب أن يكون التشريح للحيوان بعيدا″ عن الحيوانات الأخرى وأماكن تخزين المواد العلفية .

2-تكون المنطقة المحيطة بمكان التشريح معرضة لأشعة الشمس .

3-يفضل أن تكون الأرضيات من الكاشي أو من الأسمنت ، وبالتالي يسهل تنظيفها وازالة المخلفات بعد اجراء التشريح .

4-وجود محرقة خاصة بالبيت الحيواني وذلك للتخلص من الحيوان بعد

تشريحة .

أدوات التشريح:

1-مشرحة خشبية خاصة بالأرنب ذات أبعاد 40 × 50 سم(الشكل 3).

2-قفازات .

3-حذاء مختبري .

4-سترة مختبرية Lab coat .

5-مقص .

6-شفرات جراحية Surgical blades .

7-قطن معقم .

8-مادة مخدرة مثل الكلوروفورم Chloroform .

9-محلول الملح الوظيفي (0.9%).



الشكل (3): المشرحة الخاصة بالأرانب .

طريقة العمل:

1-تثبيت الحيوان المختبري على المشرحة ومن ثم وضع قطنة مبللة بالمادة المخدرة على أنف وفم الحيوان المختبري .

2-بعد التأكد من حدوث عملية التخدير يقلب الحيوان بسرعة بحيث تكون بطنة الى الأعلى .

3- يرفع الجلد في منطقة البطن ومن ثم يؤخذ المقص ويتم عمل فتحة دائرية لايتجاوز قطرها 3 سم .

4-بعدها يتم فتح جلد جسم الحيوان بالمشرط من منطقة الفتحة الاولى في البطن الى الجهة العلوية ، وعند الوصول الى القفص الصدري وعضلة الحجاب الحاجز diaphragm يتم فتح منطقة عظم القص sternum والحجاب الحاجز بواسطة المقص وذلك لغرض مشاهدة الرئتين والقلب ، وكما هو موضح في الشكل (4) .

5-اذا اردنا الحصول على عينة الدم من الحيوان فيجب ان يكون ذلك قبل التخدير ، حيث توضع عينة الدم في انبوبة حاوية على مانع التخثر EDTA اذا أردنا تقدير المعايير الدموية ، في حين اذا اردنا الحصول على المصل توضع عينة الدم في انبوبة خالية من مانع التخثر وبعدها تترك بوضع مائل ثم تطرد مركزيا" .

6-في حالة أخذ العينات للأعضاء الداخلية يفضل أخذ الرئتين والقلب وغيرها قبل أخذ عينات الامعاء لتقليل التلوث الناتج الأمعاء .

7-يفضل غسل العينة جيدا" بمحلول الملح الوظيفي للتخلص من جميع

المواد العضوية الموجودة فيها .

8-خزن العينات التي تم الحصول عليها في مكان مبرد في حالة جمعها للفحص البكتيري .

9-تحفظ العينات لغرض الدراسة النسجية في محلول الفورمالين بنسبة 10%.

10-يؤخد الحيوان بعد التشريح ويوضع في المحرقة الخاصة بالبيت الحيواني لغرض التخلص منه .



الشكل (4): الوضع المناسب لتشريح الارنب .

الملاحظات و الاستنتاجات:

1-يجب فحص الحيوانات المختبرية قبل اختيارها والتأكد من خلوها من اي خمج طبيعي او مستحصل ، فاذا تبين انها مريضة او حاملة لجرثوم فان مستوى الاضداد تجاه الممرضات الجرثومية يكون عالي وبذلك لا يمكن اختيارها لأجراء الاختبارات .

2-استعدادية الحيوان للإصابة.

3-امكانية انتقال المرض من الحيوان المريض الى السليم ومنه الى الانسان.

3- عترة الحيوان: فهناك عتر من الحيوانات كالفئران تكون خالية من الجراثيم و تدعى Gnotobiotic.

4-عند حدوث تفشي لمرض جرثومي معين يفضل التخلص من حيوانات المصابة وتعقيم بيئتها.

حقن الحيوانات المختبرية Injection of Laboratory Animals

هنالك العديد من الحيوانات المختبرية قد تم اختيارها من قبل الباحثين لأجراء التجارب المناعية والميكروبية والدوائية ومن أهمها الفئران ، الجرذان ، الأرانب ، خنازير غينيا ، القرود، الكلاب والدجاج وغيرها .

يجب أعتماد العديد من الصفات في الحيوانات المستخدمة في التجارب :

1- الوزن Weight.

2- العمر Age .

3- الجنس Gender .

4- النقاء الوراثي Genetic purity .

5- صحة الحيوان Animal health أي غير مصاب بالعدوى الميكروبية.

يمكن استخدام الأرانب في هذة التجربة وحسب طريقة الحقن :

أ- طريقة الحقن تحت الجلد Subcutaneous route :

1- أحلق الشعر في المنطقة المراد الحقن فيها بأستخدام شفرة الحلاقة .

2- امسح المنطقة بواسطة قطنة مبللة بالكحول الأثيلي بتركيز 70%.

3- اسحب الجلد الى الأعلى بواسطة اليد اليسرى ماسكا" الجلد بين السبابة والأبهام .

4- أمسك المحقنة الطبية باليد اليمنى على أن يكون أصبع السبابة تحت الأبرة وفتحتها متجهة نحو الاعلى .

5- ادخل الأبرة في الجلد بهدوء ثم ادفعها تدريجيا" ويبطئ الى تحت الجلد بحيث تكون موازية للعضلة تحت الجلد.

6-أحقن المادة الموجودة في المحقنة الطبية تحت الجلد .

7-أضغط بابهام اليد اليسرى على منطقة الحقن وأسحب الأبرة بهدوء .

8-أستمر بالضغط على منطقة الحقن لمدة نصف دقيقة للتاكد من عدم خروج المادة المحقونة .

9-دلك مكان منطقة الحقن باليد (شكل5).



شكل(5): الحقن تحت الجلد .

ب- طريقة الحقن في البريتون Intraperitoneal route:

1-بمساعدة شخص أخر أجعل الأرنب أو خنزير غينيا أو الجرذ مضطجعا" على جانبة.

2-أحلق الجلد في منطقة تحت وسط الخط الوسطي للبطن بواسطة شفرة الحلاقة .

3- عقم المنطقة بواسطة قطنة مبللة بالكحول الأثيلي بتركيز 70%.

4- أمسك المحقنة الطبية باليد اليمنى على أن تكون السبابة تحت الأبرة وفتحتها باتجاه الاعلى .

5-أسحب الجلد في منطقة البطن باليد اليسرى الى الأعلى .

6-أدخل الأبرة داخل الجلد بوضع مائل بزاوية 30 درجة مع منطقة البطن ، ثم أدفع الأبرة بأتجاه عمودي على جلد البطن والى الأعلى ويسرعة الى أن يعبر جدار البريتون .

7-تاكد من ان الأبرة داخل البريتون وليست في الأحشاء البطنية وذلك بسحب مكبس المحقنة الى الأعلى قليلا.

8- احقن المادة المراد حقنها في داخل البريتون .

9-اضغط على منطقة الحقن وأسحب المحقنة بسرعة واستمر بالضغط على محل الحقن لمدة نصف دقيقة .

10-دلك منطقة الحقن باليد (شكل 6).



الشكل(6): طريقة الحقن في البريتون .

ت-طريقة الحقن في الوريد Intravenous route :

1-احلق شعر الاذن من الحافة بواسطة شفرة الحلاقة .

2-ابحث عن الوريد الاذني الخارجي الممتد بموازاة حافة الاذن .

3-امسك الاذن باليد اليسرى بين السبابة والابهام وامسح الجلد بالقطنة المبللة بالكحول الاثيلي (70%) ، ثم اضرب الاذن ضربات خفيفة بواسطة الاصبع الوسطى من اليد اليمنى لكي يتوسع الوريد .

4-امسك مكبس المحقنة باليد اليمنى ثم ضع اصبع السبابة تحت الابرة بحيث تكون حافتها المفتوحة الى الاعلى .

5-ادخل الابرة في الجلد بحيث تكون المحقنة مع الجلد بزاوية حادة(30 درجة) ويكون رأس الابرة باتجاة مجرى الدم نحو الرأس.

6-ادفع الابرة تحت الجلد برقة بموازاة الوريد ، اي ان الابرة تصبح موازية لسطح الأذن ثم ادفعها تدريجيا" الى داخل الوريد.

7-احقن المادة المطلوبة.

8-اضغط باليد اليسرى على مكان الحقن بواسطة قطعة قطن مبللة بالكحول ثم اسحب الابرة.

9-استمر بالضغط على مكان الحقن لمدة نصف دقيقة لكي لاتخرج المادة المحقونة في الوريد.

10-دلك مكان الحقن (الشكل7).

11-في حالة حصول انتفاخ او ورم اثناء الحقن فمعنى ذلك ان الابرة ليست في الوريد اي خارجه ، ولذلك يجب سحبها قليلا" الى الوراء ومن ثم ادخالها الى الوريد مرة اخرى .



الشكل (7): الحقن في الوعاء الدموي للأذن في الأرنب .

□التخفيف Dilution

1- الهدف:

دراسة مفهوم التخفيف و تطبيقاته في تحضير الكواشف المصلية و كمتطلب اولي لتحديد العيار titer ، ومن تطبيقات التخفيف هي :

ا- تحديد تركيز البروتين الكلي.

2- تحديد تركيز الكلوبيولين المناعي.

3- تحديد تركيز المواد الحيوية في مصل الدم.

4- تحديد العيار.

5- دراسة منحني المعايرة و تحديد التناسب الأمثل بين الضد و المستضد.

2- الاساس العلمي:

التخفيف هو التقليل المتسلسل لتركيز المادة في المحاليل او في السوائل الجسمية و هنالك ثلاث طرق للتخفيف:

أ-التخفيف الثنائي

ب-التخفيف العشاري الثنائي

ت-التخفيف العشاري

3- المواد والادوات المستخدمة :

أ-الامصال او المستضدات.

ب- المحلول الملحي الفسلجي.

ت -انابيب التخفيف.

ث- مساند انابيب.

ج- شريحه بلاستيكية ذات حفر.

ح- ماصة دقيقة مع رؤوس بلاستيكية.

4- طريقة العمل:-

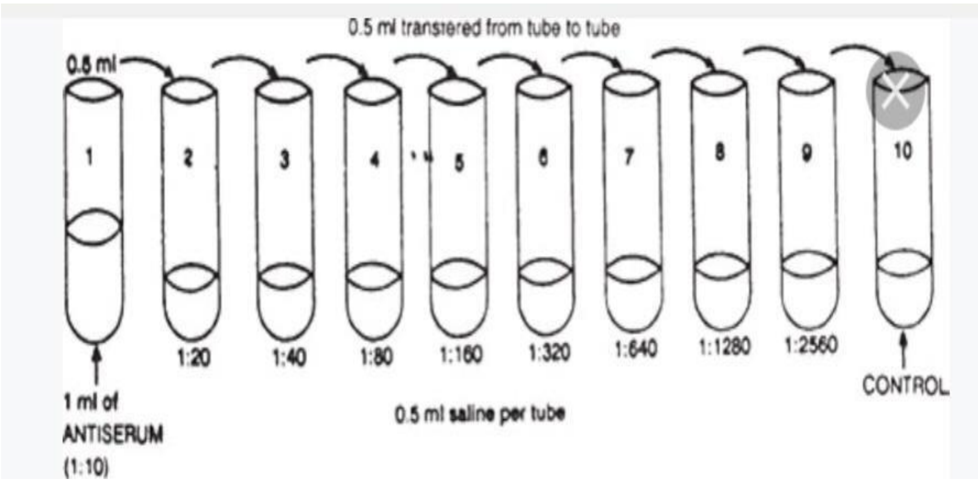
أ- التخفيف الثنائي:

1- نأخذ ثمانية من الانابيب و نرقمها من 1 الى 8 .

2- نأخذ كمية 0.5 ml من المحلول الملحي بتركيز 0.85% و نضعها في كل من الانابيب الثمانية المرقمة.

3- ننقل 0.5 ml من المصل او المستضد المراد تخفيفه الى الأنبوبة رقم (1) و يرج الانبوب جيدا او يسحب و يعاد محتوى الانبوبة مع المخفف لأكثر من مرة بواسطة الماصة.

4- بواسطة ماصة دقيقة micropipette ينقل 0.5 ml من الانبوبة الاولى و يضاف للثانية و يمزج بالسحب والاعادة المتكررة بالماصة ثم ينقل الى الانبوبة الثانية و تعاد عملية المزج ثم ينقل الى الانبوبة الثالثة وتعاد العملية السابقة حتى الانبوبة الثامنة تمزج ، بعدها يسحب 0.5 ml المخفف و يترك خارجا″، وكما هو موضح في الشكل (8).



الشكل (8): التخفيف الثنائي للعينات .

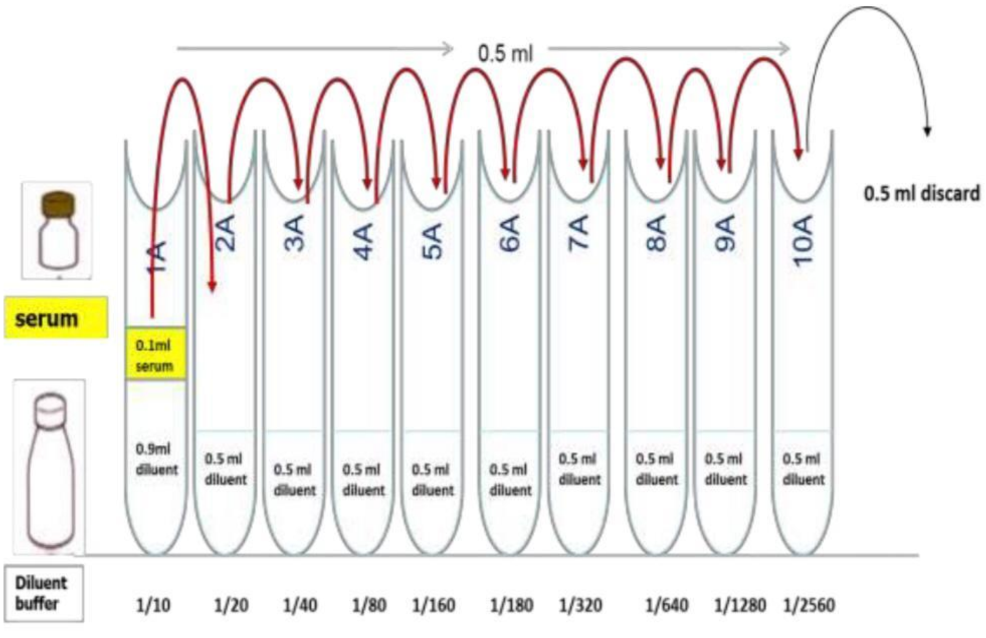
ب- التخفيف العشاري الثنائي:

1- ناخذ ثمانية انابيب و نرقمها من 1 الى 8 .

2- ناخذ كمية 0.9 ml من المحلول الملحي و نضعها في الانبوبة الاولى ، في حين توضع كمية 0.5 ml من المحلول الملحي لكل من الانابيب من 2 الى 8.

3- نضيف كمية 0.1 ml من المصل الى الانبوبة الاولى ونمازجها مع المخفف بالسحب والاعادة ، ثم نأخذ 0.5 ml منها و نضيفها الى الانبوبة الثانية.

4-تعاد عملية التخفيف كما في الخطوة الرابعة من الفقرة أ ، وكما هو موضح بالشكل (9).



الشكل(9): التخفيف العشاري – الثنائي للعينات .

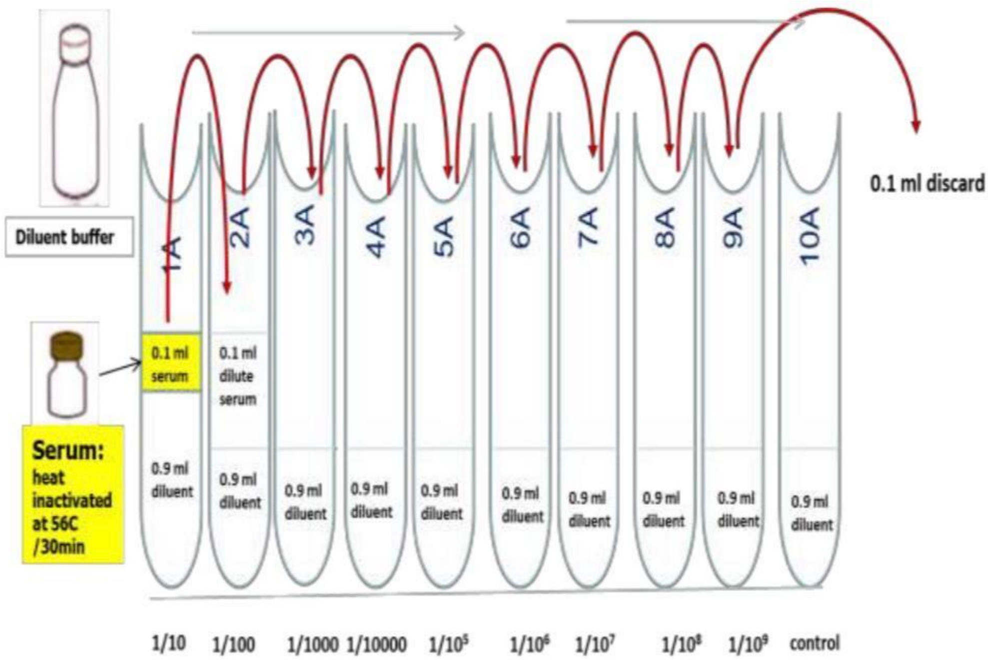
ج- التخفيف العشاري:

1- نأخذ ثمانية من الانابيب و نرقمها من 1 الى 8.

2- نأخذ كميـة 0.9 ml من المحلول الملحي بتركيز 0.85% و نضيفها لكل من الانابيب الثمانية المرقمة.

3- نضيف 0.1 ml من المصل او المستضد المراد تخفيفه الـى الأنبوبـة رقم (1) و يرج الانبوب جيدا" او يسحب و يعاد محتوى الانبوبـة مـع المخفف لأكثر من مرة بواسطة الماصة الدقيقة .

4- ننقل 0.1 ml من الانبوبة الاولى الى الانبوبة الثانية وتعاد نفس العمليـة حتى الانبوبة الثامنـة كما في الخطوة الرابعـة من الفقرة أ، وكمـا هو موضـح فـي الشكل (10).



الشكل(10): التخفيف العشاري للعينات .

د- التخفيف بالشريحة البلاستيكية ذات الحفر:

يمكن تنفيذ التخفيف الثنائي و العشاري الثنائي في الشريحه البلاستيكية ذات الحفر بحجم 50µ لكل من المخفف و المصل.

ملاحظات:

1- اسلوب التخفيف

التخفيف الثنائي حجم واحد مادة / حجم واحد مخفف

التخفيف العشاري الثنائي حجم واحد مادة / 9حجم مخفف ثم حجم واحد مادة / حجم واحد مخفف

التخفيف العشاري حجم واحد مادة / 9حجم مخفف

2- التركيز

ا- التخفيف الثنائي 2:1 4:1 8:1 16:1 32:1 64:1 128:1

ب- التخفيف العشاري الثنائي 10:1 20:1 40:1 80:1 160:1 320:1 640:1

ج- التخفيف العشاري

$10^1:1$ $10^2:1$ $10^3:1$ $10^4:1$ $10^5:1$ $10^6:1$ $10^7:1$

The concept of titration مفهوم المعايرة

1- الهدف:

تقدير الاستجابة المناعية الخلطية بعد التحفيز بمستضد معين .

2- أهمية العيار :

أ- العيار مهم في تحديد نوع المصل الممنع و شدة التفاعل او الالفة.

ب- يعمل على تحديد مسار العدوى الميكروبية.

ت- يعمل على تحديد مدى الوقاية المناعية ضد بعض الخمجات الميكروبية.

3- الاساس العلمي:

العيارTiter او المعيار الحجمي للضد وهو يمثل مقلوب أعلى تخفيف الذي يظهر 50% الى 100% نتيجة ايجابية واضحة في التفاعل المصلي تحت ظروف التفاعل القياسية، وغالبا" ما تؤخذ نقطة النهاية 100% التي تمثل مقلوب اعلى تخفيف يعطي نتيجة ايجابية واضحة للتفاعل المصلي عند الظروف القياسية. تكون نتيجة التفاعل بأحد الاشكال التالية:

1- التلازن Agglutination

2- الترسيب Precipitation

3- تعادل السمية في الزجاج او في الحيNeutralization in vivo

4- تثبيت المتمم Complement fixation test

5- الحل الدموي في الحيBlood cytolysis in vivo

7- التألق المناعي Immunofluorescence

8- تثبيط فعل الانزيم او الهرمون Enzyme or hormone inhibition

9- ظهور التغيير اللوني نتيجة فعل انزيمي مناعي يقرأ بجهاز المطياف.

4- المواد و الادوات المستخدمة :

1- حيوانات مختبرية ممنعة بالمستضد.

2- المستضد المنبه محضر بشكل قياسي.

3- محاقن نبيذة.

4- ماء الملح الوظيفي.

5- انابيب تخفيف.

6- ماده حافظة للمصل Sodium azide .

7- كريات دم حمر مدبوغة و ممنعة بالمستضد.

8- شريحة بلاستيكية ذات حفر.

9- ماصه دقيقة و رؤوس بلاستيكية .

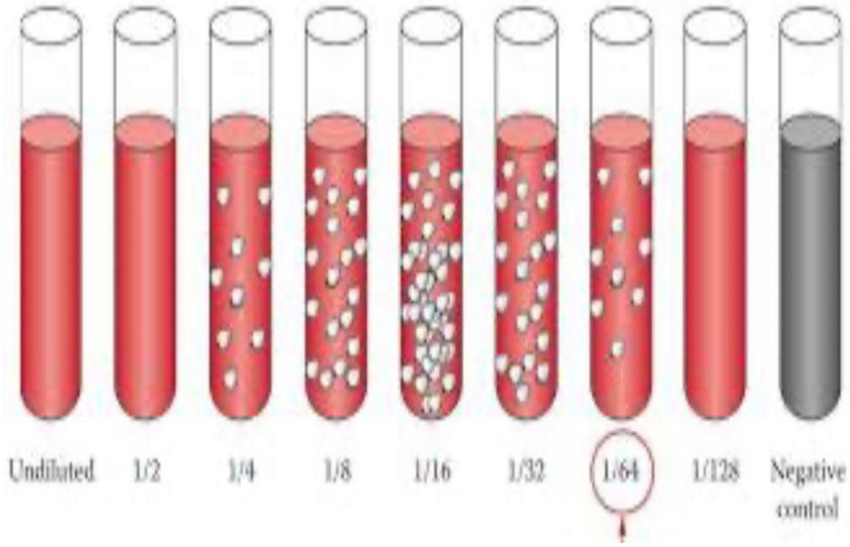
10 –حاضنة بدرجة حرارة 37 C°

5-الطرق المستخدمة:

تكون الطرق المستخدمة حسب طبيعة المستضد ، توفر الكواشف المناعية و طبيعة الدراسة المطلوبة.

6- النتائج :

يكون العيار مقلوب اعلى تخفيف الذي يعطي تلازنا" واضحا" في سلسلة التخافيف (الشكل 11)، أو هو مقلوب اعلى تخفيف الذي يعطي حلقة الترسيب، اوخط الترسيب في تفاعل الترسيب، او انعدام الحل الدموي في اختبار حل المتمم.



الشكل(11): العيار أو التخفيف الثنائي الذي يمثل مقلوب أعلى تخفيف يعطي نتيجة موجبة .

7–التخفيف و العيار في المفهوم المصلي عند التفاعل:

التخفيف الثنائي	**2**	**4**	**8**	**16**	**32**	**64**	**128**
التخفيف العشاري الثنائي	**10**	**20**	**40**	**80**	**160**	**320**	**640**
التخفيف العشاري	10^1	10^2	10^3	10^4	10^5	10^6	10^7

تقدير تراكيز البروتينات المناعية في المصل و الافرازات

1- الهدف :

أ- تقديرتركيز البروتين الكلي في المصل.

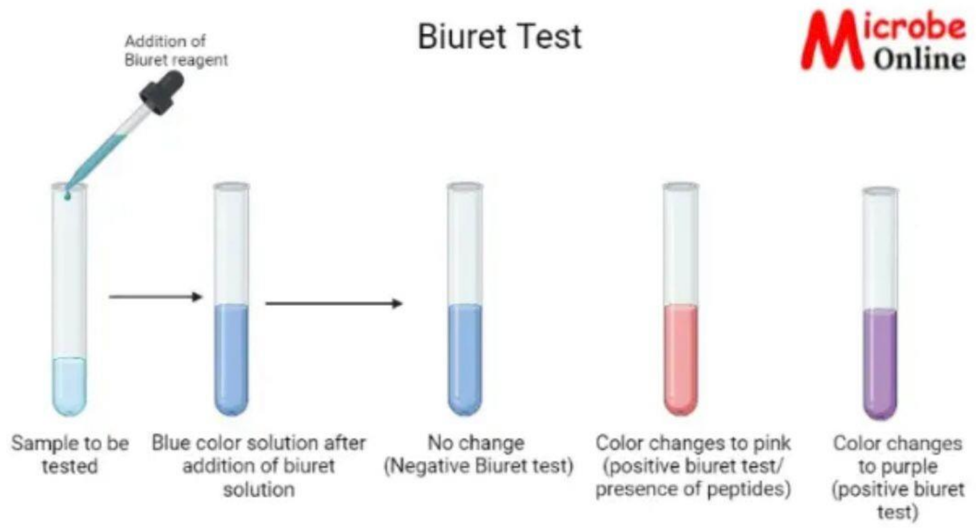
ب-تقدير تركيز الكلوبيولين المناعي في المصل.

ت-تقدير تركيزالكلوبيولين المناعي في الافرازات.

2- الاساس العلمي:

أ- استخدام طريقة ناجحة لفصل البروتين و الكلوبيولين المناعي من المصل و الافرازات.

ب- تفاعل بيوريت: هو اختبار كيميائي يستخدم لمعايرة البروتين في الدم والسوائل الحيوية للجسم وذلك بوجود شوارد النحاس في وسط قلوي ، حيث ينتج عنه معقدات بنفسجية اللون بحيث تتناسب شدة اللون مع تركيز البروتين وذلك حسب قانون بير-لامبرت . تتم معايرة هذا التفاعل اللوني بالاستفادة من جهاز المطياف الضوئي spectrophotometer وبطول موجي 560 nm ، اذ يتم في هذه الطريقة تفاعل ايونات النحاس مع الاواصر الببتيدية المكونة للبروتينات لتعطي اللون الازرق او البنفسجي(الشكل 12)، و لحدوث هذا التفاعل لابد من وجود اصرتين ببتيديتين او اكثر ليتكون اللون البنفسجي .ان هذا التفاعل يعطي فكره عن مدى المناعة الغير متخصصه للفرد سواء كانت جيدة ، متوسطة او واطئة.



الشكل(12): اختبار بايوريت لتقدير وجود البروتين في عينات المصل .

3- طريقة العمل:

أ-تحضير محلول الكلايكول المتعدد الاثلين(PEG):

يتم وزن 3 غرام من محلول منظم ترسTris buffer solution و اذابته في 250 مل ماء مقطر ، بعدها يتم اضافة 1.5 غرام من PEG واذابته في 250 مل محلول منظم ترس . يتم تعديل الاس الهيدروجيني(PH) للمحلول الناتج الى 7.4 باستخدام محلول هيدروكسيد الصوديوم NaOH (1M).

ب-تقدير تركيز البروتين الكلي في المصل :

1-يتم فصل المصل من الدم الموجود في الأنابيب من دون مانع التخثر بواسطة جهاز الطرد المركزي بسرعة 2500 دورة/ دقيقة لمدة عشرة دقائق.

2-يؤخذ 0.1 مل من المصل ويضاف الى أنبوبة تحتوي على 5 مل من

محلول البايوريت.

3- تقرا النتيجة بعد فترة حضانة في الظلام لمدة 15 دقيقة على طول موجي 560 nm بجهاز المطياف الضوئي.

4-يمكن تقدير تركيز البروتين الكلي في المصل بطريقة بايوريت باستخدام عدة خاصة (الشكل 13).



الشكل(13): العدة الخاصة لتقدير تركيز البروتين الكلي في المصل باستخدام طريقة بايوريت .

ت-تقدير تركيز الكلوبيولين المناعي في المصل:

1- خذ 5مل من المصل و اضف له 0.9 غم من مسحوق كبريتات الصوديوم اللامائي و يحضن لمدة نصف ساعة بدرجة حرارة 25°م.

2- يوضع المحلول فى جهاز الطرد المركزي بسرعة 3500 دورة/ دقيقة لمدة عشرة دقائق ، ثم يتم رمي الرائق و اضافة 2.5 مل من الماء المقطر لاذابة الراسب.

3- يضـاف 0.7 غـم مـن مسـحوق كبريتـات الامونيـوم و يحضـن لمـدة 15 دقيقة .

4- يوضع المحلول فى جهاز الطرد المركزي بسرعة 3500 دورة/ دقيقة لمدة عشرة دقائق ، ثم يتم رمي الرائق و اضافة 2.5 مل من الماء المقطر لاذابة الراسب.

5- يؤخذ 0.1 مل من المحلول ويضاف الى 5 مل من محلول البايوريت.

6-تقرا النتيجة بعد فترة حضانة بالظلام لمدة 15 دقيقة على طول موجي 560 nm بأستخدام جهاز المطياف الضوئي (الجداول 1و2و3 والشكل 14).

ث-تقدير تركيز الكلوبيولين المناعي في المصل باستخدام محلول الكلايكول المتعدد الاثلين:

1-يؤخذ 5 مل من المصل و يضاف له 5 مل من محلول الكلايكول المتعدد الاثلين ثم يحضن لمدة نصف ساعة بدرجة حرارة 25°م.

2- يوضع المحلول فى جهاز الطرد المركزي بسرعة 3500 دورة/ دقيقة لمدة عشرة دقائق ، ثم يتم رمي الرائق و اضافة 1مل من محلول الملح الوظيفي لاذابة الراسب.

3- يؤخذ 0.1 مل من المحلول ويضاف الى 5 مل من محلول البايوريت.

4- تقرا النتيجة بعد فترة حضانة بالظلام لمدة 15 دقيقة على طول موجي 560 nm بأستخدام جهاز المطياف الضوئي.

ج-تقدير تركيز الكلوبيولين المناعي في الافرازات:

1- تخلط و تجانس عينة البراز.

2- يؤخذ 2 غم من البراز و يضاف لها 10 مل من محلول الملح الوظيفي بتركيز 0.5%.

3- يوضع المحلول فى جهاز الطرد المركزي وينبذ بسرعة 3500 دورة/ دقيقة لمدة نصف الساعة.

4- يجمع الرائق وينبذ بسرعة 4000 دورة/ دقيقة لمدة 15 دقيقة .

5- يتم اضافة 5 مل من محلول كبريتات الامونيوم بتركيز 40% الى 5 مل من الرائق و يترك المحلول بدرجة حرارة الغرفة لمدة نصف ساعة.

6- يطرد المحلول بواسطة جهاز الطرد المركزي بسرعة 3500 دورة/ دقيقة لمدة نصف الساعة ، ثم يتم رمي الرائق و اضافة1 مل من محلول الملح الوظيفي للراسب و يحفظ في الثلاجة.

7 – يؤخذ 0.2 مل من المحلول اعلاه ويضاف اليه 5 مل من محلول البايوريت.

8- تقرا النتيجة بعد فترة حضانة في الظلام لمدة 15 دقيقة على طول موجي 560 nm بأستخدام جهاز المطياف الضوئي.

ح-تقدير تركيز الكلوبيولين المناعي في الادرار باستخدام محلول الكلايكول المتعدد الاثلين :

1- يجمع 5 مل من الادرار وينبذ باستخدام جهاز الطرد المركزي بسرعة 3500 دورة/ دقيقة لمدة نصف ساعة.

2- يجمع الراشح ويوضع في انبوبة معقمة.

3- يؤخذ 3 مل من الراشح و يضاف له 3 مل من محلول الكلايكول المتعدد

الاثلين ثم يحضن لمدة نصف ساعة بدرجة حرارة 25°م.

4- يطرد المحلول باستخدام جهاز الطرد المركزي بسرعة 3500 دورة/ دقيقة لمدة عشرة دقائق ، ثم يتم رمي الرائق و يضاف له 1مل من محلول الملح الوظيفي لإذابة الراسب.

5- يؤخذ 0.1 مل من المحلول ويضاف الى 5 مل من محلول البايوريت.

6- تقرا النتيجة بعد فترة حضانة بالظلام لمدة 15 دقيقة على طول موجي 560 nm بأستخدام جهاز المطياف الضوئي.

جدول(1): تخافيف مصل الألبومين البقري المستخدمة في تقدير تراكيز البروتين الكلي والكلوبيولينات المناعية .

Dilution Bovine Serum Albumine (BSA)

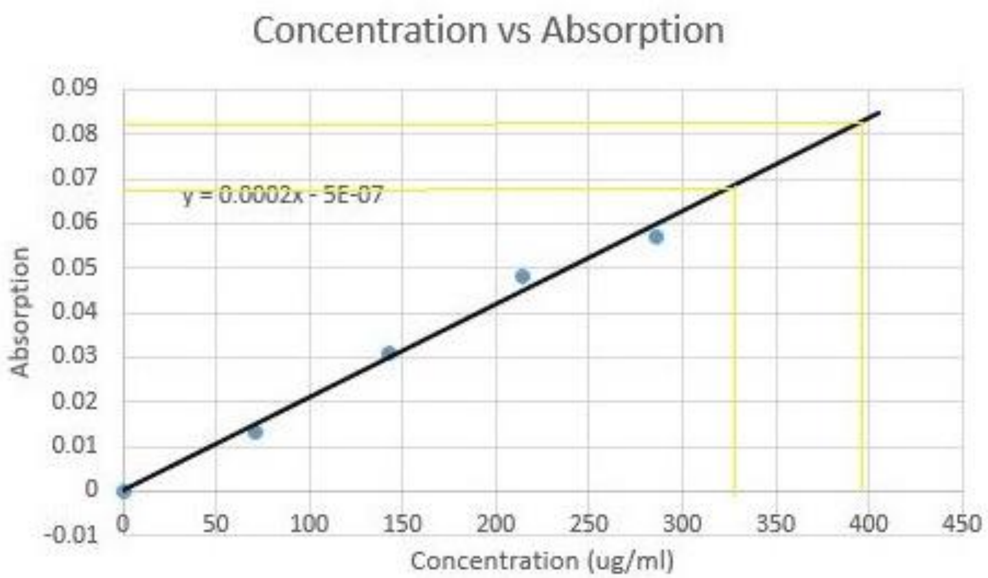
Tube #	Stock BSA Solution (1000 μg/ml)	dH_2O	Biuret Reagent
1 (blank)	0 ml	10 ml	4 ml
2	1 ml	9 ml	4 ml
3	2 ml	8 ml	4 ml
4	3 ml	7 ml	4 ml
5	4 ml	6 ml	4 ml
6	5 ml	5 ml	4 ml
Tube #	Stock Unknown (? μg/ml)	dH_2O	Biuret Reagent
Unknown #1	10 ml	0 ml	4 ml
Unknown #2	10 ml	0 ml	4 ml

الجدول(2): بيانات المنحني القياسي الى الألبومين المصلي البقري باستخدام محلول بايوريت.

Tube #	Stock BSA Solution (1000µg/ml)	dH_2O	Biuret Reagent	Final Conc. (µg/ml)	Abs. 1	Abs. 2	Mean Abs.
1(blank)	0 mL	10 ml	4 ml	0	0	0	0
2	1 ml	9 ml	4 ml	71.4	0.013	0.013	0.013
3	2 ml	8 ml	4 ml	142.9	0.031	0.031	0.031
4	3 ml	7 ml	4 ml	214.3	0.048	0.048	0.048
5	4 ml	6 ml	4 ml	285.7	0.049	0.049	0.049
6	5 ml	5 ml	4 ml	357.1	0.057	0.057	0.057
–							
Tube #	Stock Unknown	dH_2O	Biuret Reagent	Final Conc. (µg/ml)	Abs. 1	Abs. 2	Mean Abs.
Unknown. 1	10 ml	0 ml	4 ml	340	0.068	0.068	0.068
Unknown. 2	10 ml	0 ml	4 ml	405	0.081	0.081	0.081

الجدول(3): الأمتصاصية الى الألبومين المصلي البقري ومحلول بايوريت في أطوال موجية مختلفة .

Wavelength	Absorbance
540 nm	0.012
560 nm	0.013
580 nm	0.010



الشكل(14): رسم بياني يوضح التركيز مقابل الأمتصاصية الى الألبومين المصلي البقري ومحلول بايوريت . حيث يمثل الخط الأصفر تقدير مستوى التراكيز المجهولة بالاعتماد على قيم الأمتصاصية .ان أفضل خط مناسب والمعادلة له equation هي موضحة في الرسم البياني .

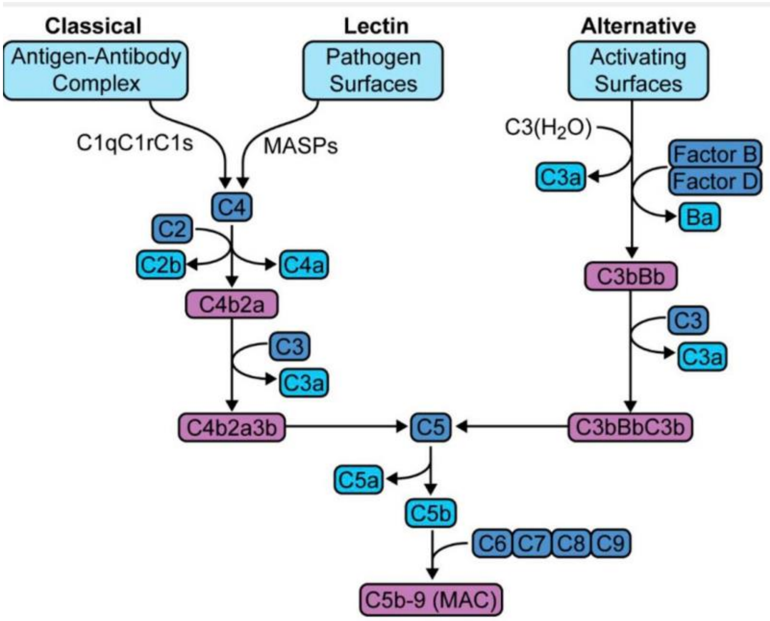
دور منظومة المتمم في ابادة الممرضات

1- المقدمة :

المتمم هو سلسلة من البروتينات المصلية التي تلعب دوراً مهماً في الاستجابة المناعية العفوية والتكيفية في الدفاع ضد الممرضات التي تجتاز الدفاعات الخلوية فعند تنشيطها مباشرة بواسطة الممرضات أو بصورة غير مباشرة من خلال الضد المرتبط مع المستضد . يتكون نظام المتمم تقريبا" من 40 نوع من البروتينات المصلية والمرتبطة بالأغشية والتي تخلق في الكبد والأمعاء الدقيقة والغليظة . ولقد أكتشف المتمم لأول مرة من قبل -العالم Jules Bordet عام 1890 م، ولقد حصل ذلك الباحث على جائزة نوبل عام 1919 عن دورة في اكتشاف التحلل البكتيري الذي يتوسطة المتمم ، ولقد سميت تلك البروتينات بالمتمم complement لأنها متممة ومكملة لعمل مكونات اخرى للجهاز المناعي كالأضداد في قتل الممرضات .

2- الاساس العلمي:

تعمل مسارات منظومة المتمم وهو التقليدي ، البديل و اللكتيني في الحل الخلوي المناعي للخلايا الهدف ، من خلال تكوين ثقوب دقيقة في جدار الخلية الهدف (بكتريا اوكريات الدم الحمر) مع مظاهر اخرى مرافقة لهذا التفاعل ، وكما هو موضح في الشكل(15).



الشكل(15): مسارات تنشيط منظومة المتمم .

3- المواد المستخدمة:

أ- دم بشري طري.

ب- ماء الملح وظيفي Normal saline .

ت- 10 مل من مرق مغذي معقم Nutrient broth.

ث- مزرعة حديثة لبكتريا *E. coli*.

ج- أطباق آكار مغذي Nutrient agar plates .

ح- حاضنة Incubator .

خ-ماصة Pipette .

4- طريقة العمل:

أ- يخفف مزروع بكتريا *E. coli* بنسبة 1:100 بالمرق المغذي.

ب- يخفف الدم البشري الطري بنسبة 1:10 بماء الملح الوظيفي المعقم.

ت- يلقح الدم البشري المخفف بنقله من المزروع البكتيري و يحضن لفترة صفر الى 40,30,20,10 دقيقة بدرجة حرارة 37م°.

ث-تؤخذ في هذه الاوقات نقلة بالعروة الناقلة من عينة الدم المضاف لها المزروع البكتيري و تزرع على طبق الاكار المغذي.

5- تسجيل النتائج :

يكون تسجيل النتائج كما يلي :

الوقت	كثافة النمو
0	
10	
20	
30	
40	

الملاحظات :

يستدل على وجود بروتينات المتمم من خلال اختزال النمو البكتيري على الأطباق الزرعية بزيادة فترة الحضانة.

أختبار صورة الدم الكاملة

Complete Blood Count(CBC)

يتكون الدم من عنصرين أساسيين وهما البلازما وخلايا الدم ، حيث يعتبر البلازما هو السائل الذي تعوم فيه الخلايا ، وتتكون البلازما من ماء وبروتينات (مثل الالبومين ، الكلوبيولين والفيبرينوجين) وبعض المكونات الأخرى ، وتمثل البلازما حوالي أكثر 50% من حجم الدم . تقسم خلايا الدم الى ثلاثة أنواع رئيسية وهي كريات الدم الحمر (RBCs) ، خلايا الدم البيض (WBCs) والصفيحات الدموية(Platelets) .

ان صورة الدم (CBC) هي أكثر التحليلات التي يطلب من المرضى اجرائها بشكل عام وذلك لانه يعطينا فكرة جيدة عن الكثير من وظائف الجسم الحيوية ، وكذلك يساعد في تشخيص العديد من الأمراض والأضطرابات التي تحدث في الجسم وكما يلي :

1-أثناء الفحص الروتيني للأطمئنان على الصحة العامة.

2-في حالات الشعور بالصداع .

3-أصفرار أو بهتان لون البشرة بشكل ملحوظ كالشك في وجود فقر الدم.

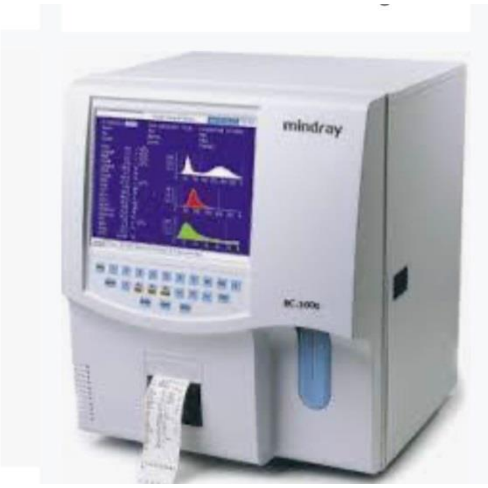
4-يطلب من المرضى الذين يعانون من نزيف متكرر أو ظهور كدمات زرقاء تحت الجلد .

5-عند الشك بوجود التهاب او عدوى معينة .

6-لمتابعة المصابين بأمراض الدم وملاحظة استجابتهم للعلاج .

7-لمتابعة مرضى الأورام الذي يتعاطون العلاج الكيميائي وذلك لرصد تأثير العلاج

على النخاع ، كما ويجب سحب الدم في ظروف معقمة وتحت رعاية صحية في مراكز التبرع بالدم حصرا" ، ومن ثم يحضر الدم وينقل الى جهاز تحليل الدم الألي(شكل16) أو استخدام الطرق التقليدية لتحليل محتوياته المطلوبة سريريا للتشخيص ثم العلاج ."

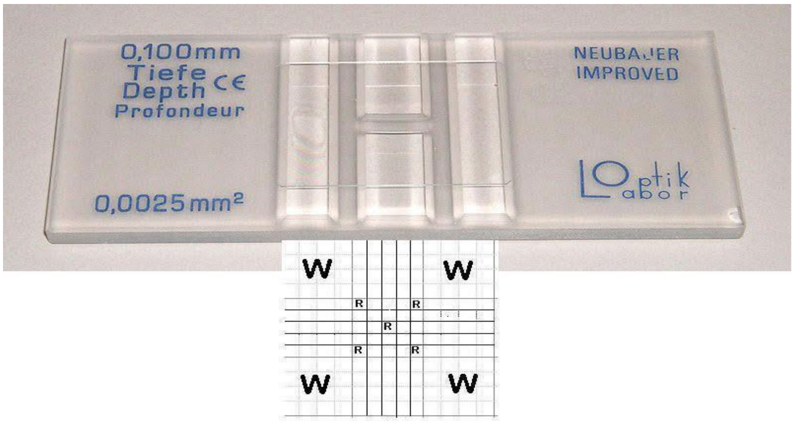


الشكل (16): جهاز تحليل الدم الألي.

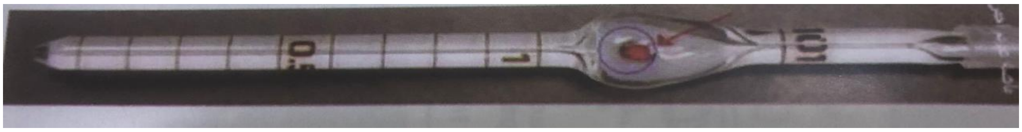
<u>الطرق التقليدية في تعداد كريات الدم الحمر:</u>

تتم هذه الطريقة باستخدام (1)عداد خلايا الدم **heamocytometer** (شكل 17) والتي هي عبارة عن شريحة زجاجية سميكة يوجد على مسرحها الوسطي 25 مربع وكل مربع منها يحتوي على 25 مربع أصغر،(2) ماصة شعرية خاصة بكريات الدم الحمر(شكل 18)، وهذه الماصة مدرجة بعلامتين الأولى سفلية 0.5 والثانية علوية101 ، حيث يمثل الرقمان حجم الفراغ داخل الماصة بالمليمترات المكعبة ، ويوجد قبل العلامة العلوية انتفاخ بالماصة حاوي على كرة زجاجية ذات لون أحمر تستخدم لتقليب المحلول.(3) استخدام محلول

التخفيف .



الشكل (17): شريحة الهيموسيتوميتر لعد كريات الدم الحمر .



الشكل(18): الماصة الشعرية الخاصة بتعداد كريات الدم الحمر.

يكون محلول التخفيف على نوعين :

1-محلول هامس Hayems solution

والـــذي يتكـــون مـــن HgCL2(25 غـــم)، NaCL(0.5 غـــم) ، Na2SO4(2.5 غم) مذابة في 100 مل من الماء المقطر.

2-المحلول الثاني الذي يتكون من :

Sodium citrate(31.3 غم)، Formalin 40 volume(10مل) ، تذوب في 1000 مل من الماء المقطر.

خطوات أجراء التجربة:

اسحب بواسطة الماصة دم غير متخثر حتى العلامة0.5 ، ثم أكمل باحد المحلولين السابقين حتى العلامة101، بعدها اغلق نهايتي الماصة بواسطة الابهام والسبابة ورج الماصة لمزج محتوياتها جيدا"، ثم ضع عينة الدم في شريحة عد خلايا الدم (الهيموسيتوميتر) وغطيها بواسطة غطاء الشريحة الزجاجي cover slide ثم أحسب عدد كريات الدم الحمر/ في الملم المكعب الواحد من الدم.

مثال :

اذا كان مجموع عدد كريات الدم الحمر في المربعات الخمسة مساويا" للعدد 450 كرية حمراء والتي تم عدها في 80 مربعا" صغيرا"(اي 5 مضروبا" في 16 مربعا") وحجم كل منها يساوي 4000/1 ملمتر مكعب ودرجة التخفيف كانت 200/1 فان عدد كريات الدم الحمر في المليمتر المكعب الواحد من الدم تحسب كالاتي :

ملم مكعب/دم =450/80×4000×200 .

خلايا الجهاز المناعي Cells of immune system

تنشأ خلايا الجهاز المناعي في نقي العظم الأحمر من الخلايا الجذعية المكونة للدم Heamatopoietic stem cells ، حيث يتألف من العديد من الخلايا وهي :

أ-خلايا الدم البيض غير المحببة A granulocytes leukocytes والتي تشمل:

1-الخلايا اللمفية Lymphocytes

تكون نواة تلك الخلايا دائرية ،مفردة ،غامقة الصبغة وتحتل معظم حجم الخلية ، حيث تكون شائعة الوجود في الجهاز اللمفاوي اذ تكون نسبتها الطبيعية في الانسان 20-30% ، وتلعب هذة الخلايا دورا" مهما" في الأستجابة المناعية المتوسطة بالخلايا ، وتقسم الى فئتين رئيسيتين وهما :

أ-الخلايا اللمفية التائية T-Lymphocytes والتي تقسم الى أربعة أقسام وهي :

1-الخلايا التائية السامة CD8 T cells

2-الخلايا التائية المساعدة CD4 Th cells والتي تقسم الى عدة صنيفات اعتمادا" على الوظيفة ونوع الحركيات الخلوية المفرزة منها وهي Th1، Th2، Th9، Th17، Th22 و TFH.

3-الخلية التائية المنظمة Regulatory T cells(Treg)

4-الخلايا الطبيعية القاتلة Natural Killer T cells (NKT cells)

ب- الخلايا اللمفية البائية B cells

تلعب هذة الخلايا دورا" مهما" في الاستجابة المناعية الخلطية من خلال افراز الأجسام المضادة المتخصصة بالمستضدات المحفزة لها .

2-الخلايا وحيدة النواة الدموية Monocytes

تكون هذة الخلايا كبيرة الحجم، نواتها كلوية الشكل وتحتوي على كمية كبيرة من السايتوبلازم، حيث تكون نسبتها 1-6% ، وعند هجرتها من الدم الى الأنسجة فهي تتمايز الى البلاعم الكبيرة Macrophages أو الخلايا الشجيرية Dendritic cells أعتمادا" على نوع الحركي الخلوي المفرز ، حيث تلعب دورا" مهما" في بلعمة المستضدات الدقائقية التي تخترق الأنسجة وتقديمها الى الخلايا التائية .

3-خلايا الدم البيض المحببة Granulocytes leukocytes

تشمل هذة الخلايا:

أ-العدلات Neutrophils

تمثل هذة الخلايا الخط الدفاعي الاول للجهاز المناعي ، حيث تكون سريعة الاستجابة ، و تكون أول الخلايا الواصلة الى موقع الألتهاب ، اذ ان لها القدرة على الالتهام وتكون اكثر خلايا الدم البيض شيوعا حيث تصل نسبتها الى 50-70 % .

ب-الحمضات Eosinophils

تكون نسبة هذة الخلايا 2-3% وتلعب دورا" مهما" في الأستجابة المناعية ضد الطفيليات حيث تهاجم يرقات الديدان التي تغزو الجسم وتزداد نسبتها في

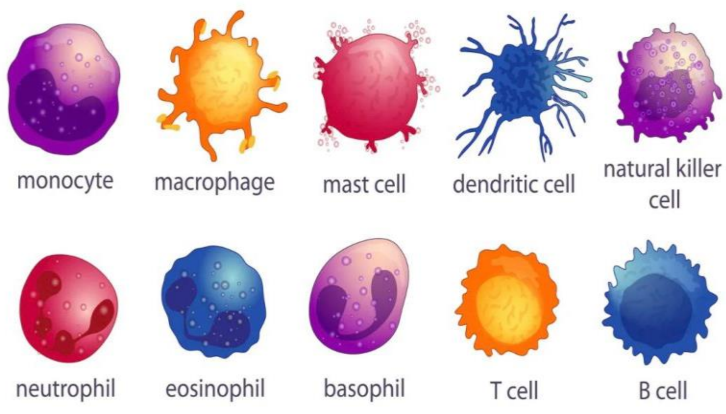
حالة تفاعلات الأرجية Allergic reactions.

ت-القعدات Basophils

تكون نسبة هذة الخلايا 0.5-1% وتشترك في الأستجابة المناعية في حالة تفاعلات الارجية في الدم وخاصة تفاعلات فرط الحساسية من النوع الاول Type 1 hypersensitivity reactions ، وعندما تهاجر الى الأنسجة يعتقد انها تتحول الى الخلايا البدينة Mast cells.

4-الخلايا القاتلة الطبيعية (Natural killer cells(NK cells

تعتبر تلك الخلايا جزءا" من خط الخلايا اللمفية ولكنها لاتمتلك المستقبلات المتخصصة وكذلك لاتمتلك الذاكرة المناعية ولكنها من حيث الشكل والوظيفة فهي مشابهه الى الخلايا التائية السامة CD8 T cells ، ولذلك فهي تلعب دورا" مهما" في الاستجابة المناعية من خلال تحطيم الخلايا السرطانية والخلايا المصابة بالفايروسات (الشكل 19).



الشكل(19): خلايا الدم البيض التي تلعب دورا" مهما" في الاستجابة المناعية .

طريقة عد خلايا الدم البيض :

يتم عد خلايا الدم البيض في عينة الدم باستخدام الهيموسيتوميتر.

الأدوات المستخدمة في التجربة :

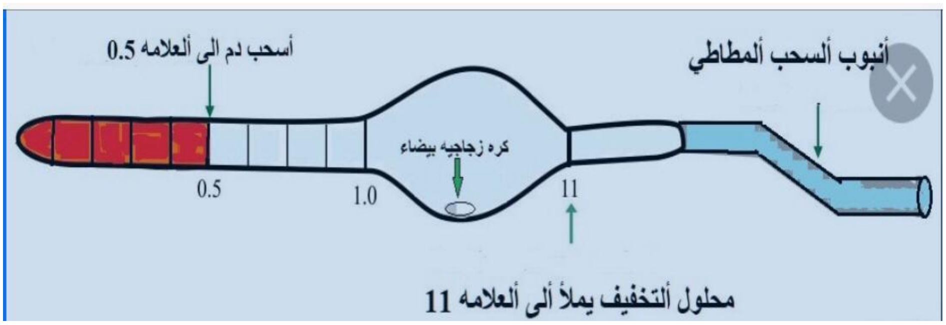
1-ماصة تخفيف خاصة تحتوي على خرزة ذات لون ابيض (شكل20).

2-الهيموسيتوميتر.

3-محلول تخفيف يتكون من حامض الخليك الثلجي (2.5 مل) لتكسير كريات الدم الحمر، 2-3 قطرات من صبغة المثيلين الزرقاء ، و 97.5 مل من الماء المقطر .

4-أغطية شرائح زجاجية.

5-مجهر ضوئي.



الشكل(20): الماصة الخاصة بتعداد خلايا الدم البيض .

مبدأ التجربة:

تعتمد التجربة على تخفيف الدم بالمحلول الخاص بتخفيف خلايا الدم البيض الذي يحلل كريات الدم الحمر، في حين يترك خلايا الدم البيض سليمة، ومن ثم تعد خلايا الدم البيض باستخدام الهيموسيتوميتر تحت المجهر.

خطوات أجراء التجربة :

1-حضر محلول تخفيف خلايا الدم البيض.

2-اسحب بواسطة الماصة دم غير متجلط حتى العلامة0.5 ، ثم أكمل بمحلول التخفيف حتى علامة 11 ، بعد ذلك افرك الماصة عند الانتفاخ بين راحتي اليد لمزج الدم بمحلول التخفيف .

3-تخلص من بضع قطرات من الدم المخفف عبر الفتحة السفلية للماصة ، وبعد ذلك ضع قطرة من الدم المخفف عند حافة الغطاء الزجاجي الموضع على الشريحة . لاحظ ان قطرة الدم سوف تنتشر بالخاصية الشعرية مابين الغطاء الزجاجي والشريحة.

4-اترك الشريحة لمدة دقيقة لكي تترسب خلايا الدم البيض ، ثم ضعها تحت المجهر للتعداد.

5-ابدأ الفحص بالقوة الصغرى لمعرفة توزيع خلايا الدم البيض حيث ينبغي أن يكون التوزيع متجانسا" أي غير متجمع ، فان وجد تجمع نظف الشريحة وضع قطرة جديدة ، وإذا تكرر وجود التجمع فهذا يعني ان الدم لم يسحب بالطريقة الصحيحة ولم يخفف كما ينبغي ، وفي هذة الحالة يجب اعادة التخفيف .

6-ولغرض عد خلايا الدم البيض استخدم العدسة الصغرى فقط، حيث يتم العد في أربعة مربعات كبيرة تقع في أركان المربع الكبير ، اذ ان كل مربع يحتوي 16 مربع صغير ، أي يتم العد في 64 مربع صغير.

حساب عدد خلايا الدم البيض:

التخفيف = 1:20

حجم المربع الصغير=(4/1)× (4/1) ×(10/1)=160/1 ملم^3 .

مثال:

نفترض ان عدد خلايا الدم البيض في 64 مربع صغير(4×16)= س، فان عدد خلايا الدم البيض في ملم^3 الواحد من الدم غير المخفف تحسب حسب المعادلة التالية:

عدد خلايا الدم البيض/ ملم^3 دم= س/64 × 160×20 خلية دم بيضاء/ ملم^3 من الدم .

Preparation of blood smear تحضير مسحة الدم

أهمية عمل المسحة الدموية:

1-عد خلايا البيض التفريقي Differential WBCs count

2-دراسة خلايا الدم ومكوناته من حيث الشكل والتركيب .

3-تشخيص الأصابة ببعض أمراض الدم كأبيضاض الدم leukemia وفقر الدم anemia وغيرها .

المواد اللازمة لأجراء هذا الأختبار :

1-مشارط معقمة .

2-شرائح زجاجية نظيفة .

3-القطن الطبي .

4-الكحول الأثيلي بنسبة 70%.

5-كمية من محلول التخفيف أو الماء .

6-محاليل الصبغات وأهمها صبغة ليشمان leishmans stain ، أو صبغة كيمزا Giemsa stain ،أو صبغة رايت Wright stain .

7-مجهر ضوئي .

خطوات تحضير مسحة الدم :

1-وضع قطرة مناسبة من الدم على مقربة من نهاية الشريحة اليمنى.

2-يتم نشر قطرة الدم بواسطة الشريحة الناشرة spreader slide وبزاوية حادة لاتتجاوز 35 درجة.

3-يجب ملامسة الشريحة الناشرة لقطرة الدم لكي تنتشر على طول حافتها قبل السحب والنشر وبشكل متجانس ورقيق (شكل 21).

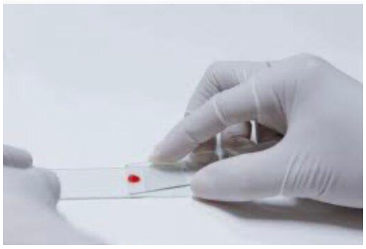
4-تترك مسحة الدم حتى تجف تماما" لبضع دقائق في مكان دافى.

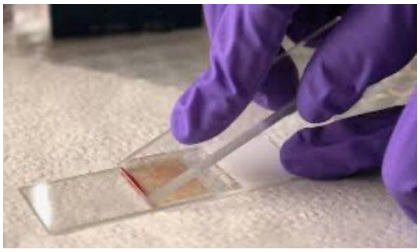
5-تضاف صبغة اللشمان أو اي صبغة مناسبة أخرى وتنشر على مسحة شريحة الدم الجافة.

6-بعد 2-3 دقائق يضاف عدد مساو من قطرات الماء الى صبغة اللشمان بهدف التخفيف ، ومن ثم يترك المزيج لمدة 5 دقائق تقريبا" مع تحريك الشريحة بلطف لكي يتم مزج الماء مع الصبغة .

7-تغسل المسحة بماء الصنبور tape water .

8-تترك الشريحة في مكان دافى لتجف ثم يتم فحصها تحت المجهر .





الشكل(21): طريقة تحضير وتثبيت مسحة الدم .

تفسيرات قراءة مسحة الدم :

1- خلايا الدم البيض : ان المعدل الطبيعي لخلايا الدم البيض بين4000-11000 خلية/م^3 ، وفي حال كون الرقم ضمن المدى الطبيعي فاننا نلجأ الى العد التفريقي لخلايا الدم البيض differential count والذي يشمل العدلات neutrophils ، الحمضات eosinophils ، القعدات basophils ، خلايا

وحيدة النواة الدموية والخلايا اللمفية lymphocytes (شكل22).

نقص عدد خلايا الدم البيض :

يشير النقصان في عدد خلايا الدم البيض الى احتمالين رئيسيين وهما أما الاصابة بالعوز المناعي الخلوي cellular immunodeficiency أو الاصابة ببعض الأخماج infections وكما يحصل في حالة الاصابة ببكتريا التايفوئيد على سبيل المثال .

زيادة العدد الكلي لخلايا الدم البيض :

يشير الارتفاع في عدد خلايا الدم البيض الى عدة احتمالات ، منها اصابة الفرد بالأمراض الخمجية ، وذلك لان معظمها تحفز الجهاز المناعي على انتاج المزيد من خلايا الدم البيض الدفاعية سواءا" كانت الاصابة بكتيرية أو فيروسية. ان بعض الامراض الدموية الخبيثة قد تسبب زيادة مفرطة في عدد خلايا الدم البيض مثل مرض أبيضاض الدم leukemia (شكل23)، من جهة اخرى تحفز بعض أمراض الأرجية والحساسية على زيادة انتاج خلايا الدم البيض . ان الزيادات النوعية في اعداد خلايا الدم البيض فيمكن ايجاز أسبابها كما يلي :

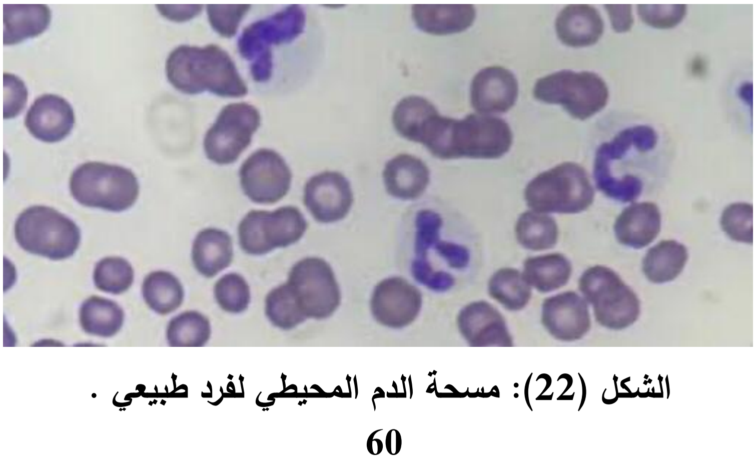
1- زيادة عدد الخلايا العدلة Neutrophilia : تعني وجود اصابة بعدوى جرثومية ، علما" ان المعدل الطبيعي يتراوح بين 50-70% ، ولابد من الأشارة الا انه في حالة زيادة عدد العدلات مع انخفاض عدد خلايا الدم البيض قد يكون السبب وجود عدوى أو التهاب مزمن في الجسم مما ادى الى انهاك خلايا الدم البيض فتسبب بقلة العدد الاجمالي لها .

2- زيـادة عـدد الخلايـا اللمفيـة Lymphocytosis : تعنـي وجـود عـدوى فيروسية ، اذ تلعب تلك الخلايا دورا" مهما" في المناعة الخلوية (T-cells) والخلطية (B-cells)، حيث ان المعدل الطبيعي لها بين 18-45% ، كما ان نقص عدد الخلايا اللمفية يحدث في بعض الحالات مثل الاصابة بفيروس كورونا (Covid-19) .

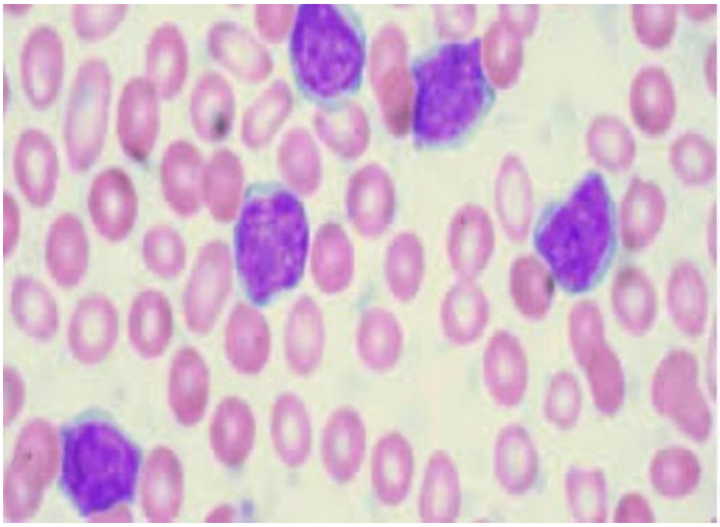
3- زيـادة عدد الخلايا احادية النواة الدموية Monocytosis : يشير الى وجـود عـدوى فطريـة ويمكـن ان تكـون ناتجـة عـن عـدوى جرثومية(بكتبريـة وفايروسية) ، حيث ان المعدل الطبيعي لهذة الخلايا هو 2-8% .

4- زيـادة عـدد الحمضـات Eosinophilia : يشـير الـى احتماليـة وجـود الاصـابة بالطفيليـات أو احتمـال وجـود حساسـية لـدى المـريض ، اي ان هـذة الخلايا هي المسؤولة عن المقاومة ضد الطفيليات وتفاعلات الأرجية allergic reactions ، وتكون النسبة المئوية الطبيعية لها هي 1-7%.

5- زيـادة عـدد القعـدات Basophilia : وهـو يشـير الـى احتماليـة وجـود مـرض منـاعي ، حيـث تنشـط هـذة الخلايـا بشـكل كبيـر فـي حـالات الحساسـية وبعض الاتهابات الاخرى ، ويبلغ المعدل الطبيعي لها هو 0-2% .



الشكل (22): مسحة الدم المحيطي لفرد طبيعي .



الشكل(23): مسحة دموية لفرد مصاب بسرطان الدم اللمفاوي الحاد .

كريات الدم الحمر RBCs :

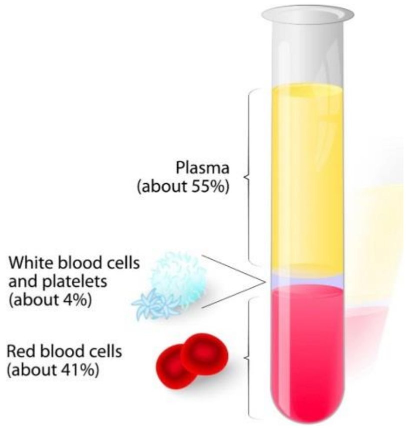
يقيس فحص صورة الدم الكاملة عدد كريات الدم الحمر في المليمتر المكعب الواحد من الدم ، حيث ان المعدل الطبيعي لها في الرجال البالغين الاصحاء يكون بين 4.6–5.8 مليون كرية دم /ملم^3 ، في حين يبلغ ذلك العدد في النساء السليمات البالغات بين 4.1–5.4 مليون كرية دم /ملم^3 . ان نقص اعداد كريات الدم الحمر ربما يعود الى نقص الحديد أو فقدان الدم(النزيف) أو حدوث تحطم الى كريات الدم أو أي سبب يؤدي الى تعطل وظيفة نقي العظم الاحمر ، أما زيادة عدد كريات الدم الحمر فيحدث في بعض الحالات مثل مرض كثرة كريات الدم الحمر Polycythemia وفي حالات نقص الاوكسجين أثناء صعود المرتفعات وفي حالات التدخين أو لاي سبب صحي أخر كممارسة الرياضات القوية مثلا".

الهيموغلوبين (Hemoglobin (Hb :

الهيموغلوبين هو الصبغة المسؤولة عن حمل الاوكسجين في كريات الدم الحمر ، ووظيفتة هو حمل و نقل الاوكسجين من الرئتين الى أنسجة أعضاء الجسم المختلفة ، ويبلغ المعدل الطبيعي له هو 14-17.5 غم/ديسي لتر في دم الذكور ، في حين يبلغ معدل تركيزة 12-15.3 غم/ديسي لتر في دم الأناث . ان نقصان نسبة الهيموغلوبين يعود الى فقر الدم التي تسبب نقص في عدد كريات الدم الحمر وهو ناتج عن نقص الحديد والنزيف الداخلي ، ولكن من ناحية اخرى فان زيادة نسبة الهيموغلوبين تعتبر مؤشرا" على وجود حالات مرضية في الرئة والقلب وكذلك تعرض الانسان الى الجفاف .

حجم مكداس الدم (Hematocrit or Pached cell volume(PCV :

هو نسبة حجم كريات الدم الحمر الى الحجم الكلي للدم(بلازما وخلايا) وكما موضح في الشكل (24) . ان المعدل الطبيعي لحجم مكداس الدم غالبا" ما يكون ثلاثة أضعاف نسبة الهيموغلوبين حيث تكون 44-52% في الذكور و37-45% في الاناث . ان نقص نسبة الهيماتوكريت تحدث في حالات اعطاء محاليل وريدية بكثرة وفي حالات النزيف ، في حين تحصل زيادة نسبته في حالات الجفاف .



الشكل(24): حجم مكداس الدم(الهيماتوكريت) الطبيعي في عينة الدم .

الصفيحات الدموية Platelets :

تلعب الصفائح الدموية دورا" مهما" في ايقاف النزيف عن طريق تكوين الخثرة الدموية التي تغلق مكان حدوث النزف الدموي ، ويبلغ المعدل الطبيعي للصفيحات الدموية 150000–400000 خلية/مايكروليتر من الدم . يحدث النقصان في عدد الصفيحات الدموية في حالات تكرار النزف وظهور العلامات الزرقاء تحت الجلد وكذلك أمراض الدم مثل ابيضاض الدم ، في حين ان الزيادة في عدد الصفيحات الدموية ينذر بخطر حدوث الجلطات الدموية في مختلف اجزاء الجسم .

معدل ترسيب كريات الدم الحمر

Erythrocyte Sedimentation Rate(ESR)

يعتبر تحليل نسبة ترسيب كريات الدم الحمر ESR أحد اختبارات الدم المستخدمة للكشف عن النشاط الألتهابي في الجسم ، حيث يقدر هذا التحليل مدى سرعة استقرار وترسب كريات الدم الحمر في قاع انبوبة الاختبار التي تحتوي على عينة الدم ، ويشير تزايد سرعة ترسيب تلك الكريات عن الحالة الطبيعية الى وجود التهاب والذي هو رد فعل الجسم لوجود عدوى ، مرض مزمن معين ، أضطراب مناعي أو اي حالة مرضية أخرى ، ولذلك كلما ازدادت عدد كريات الدم الحمر المترسبة في العينة دل على أن الاستجابة المناعية ضد الالتهاب هي أشد ، وذلك لان هذا التحليل قد يساعد في تشخيص أو مراقبة تقدم المرض الألتهابي ، ولكن هذا الأختبار لايمكن الاعتماد علية بشكل منفرد في تشخيص مسببات الألتهاب لانه فحص غير متخصص Nonspecific ، لذلك عادة ما يترافق اجراءة مع اختبارات أخرى مثل البروتين التفاعلي-سي(C-reactive protein) وهو أحد بروتينات الطور الحاد الألتهابية .

دواعي أجراء تحليل ESR :

1- بعض حالات الصداع .
2- وجود ألم في الكتفين ، الرقبة أو الحوض .
3- وجود تصلب ، ألم أو تورم في المفاصل .
4- فقدان الشهية.

5- نقصان في الوزن غير متعمد.

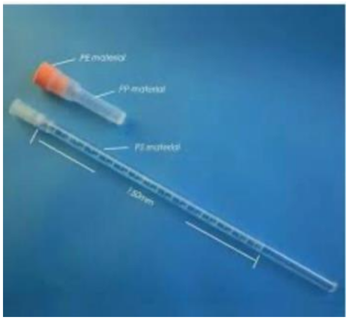
6- حمى غير معروفة السبب .

7- تحديد شدة الاستجابة المناعية للجسم ومراقبة تأثير العلاج ، وكجزء من عملية الكشف عن وجود أمراض معينة مثل الأخماج وأمراض غير خمجية مثل السرطان ، التهاب الشرايين وأمراض المناعة الذاتية.

طريقة عمل أجراء هذا الاختبار :

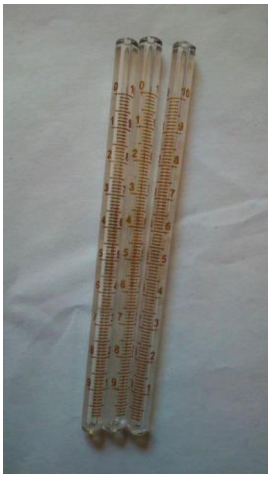
هنالك طريقتان لقياس معدل ترسيب كريات الدم الحمر :

1- طريقة ويستيرجن Westergen method: وهي الأكثر استخداما" ، حيث يتم في هذا الأختبار سحب الدم (بوجود مانع التخثرEDTA) الى أنبوب westergen –katz (الشكل25) الذي يبلغ طولة 30 سم حتى يصل الى مستوى 200 مليلتر أي هو مدرج من 0-200 ، ثم يترك الأنبوب بشكل عمودي على حامل خاص في درجة حرارة الغرفة لمدة ساعة ، حيث يتضمن القياس تحديد المسافة بين الجزء العلوي من خليط الدم والجزء العلوي من ترسيب كريات الدم الاحمر ، وفي هذة الطريقة فأن القيم الطبيعية للترسيب تكون 0-15، 0-20 و0-10 (مليلتر/ ساعة) للذكور والأناث والاطفال على التوالي .



الشكل (25): انبوبة ويستيرجن المستخدمة في تقدير ESR .

2-طريقة واينتروب Wintrobe method : وهي تشبة الى حد كبير طريقة ويستيرجن ، ولكن الاختلاف الرئيسي هو ان الانبوب(الشكل26) يبلغ طولة 11 سم وهو مدرج من 0-100مليلتر ، ولكن هذة الطريقة في القياس هي أقل حساسية مقارنة مع الطريقة السابقة . في هذة الطريقة فأن القيم الطبيعية للترسيب تكون 0-9، 0-20 و0-13 (مليلتر/ ساعة) للذكور والأناث والاطفال على التوالي .



الشكل(26): انبوبة واينتروب المستخدمة في تقديرESR .

تفسير نتائج فحص ESR:

ان القيم المنخفضة الى فحص ESR تدل على ما يلي :

1- فقر الدم المنجلي Sickle cell anemia وهي حالة مرضية تؤثر في شكل كريات الدم الحمر.

2- سرطان خلايا الدم Leukemia .

3- ارتفاع عدد كريات الدم الحمر .

4- ارتفاع لزوجة الدم .

5- ارتفاع كبير في أعداد خلايا الدم البيض .

6- أنخفاض مستوى بروتين الفيبرينوجين Fibrinogen وهو أحد بروتينات الطور الحاد المضادة للالتهاب .

7- فشل القلب الاحتقاني Congestive heart failure .

أما القيم المرتفعة قليلا" الى ESR فقد لا تشير بالضرورة على وجود حالة مرضية لدى الفرد ، ولكنها تدل أحيانا" عما يلي :

1- وجود ألتهاب المفاصل الروماتويديRheumatoid arthritis .

2- فقر الدم Anemia ، أي انخفاض عدد كريات الدم الحمر.

3- مرض في الكلى .

4- التهاب في الغدة الدرقية Thyroiditis .

5- تشوهات في كريات الدم الحمر ، مثل تضخم حجم كريات الدم الحمر Macrocytosis .

6- عدوى في العظام .

7- عدوى في القلب .

8- وجود بعض السرطانات مثل سرطان الغدد اللمفية.

9- عدوى جهازية Systemic infection .

البلعمة Phagocytosis

1- المقدمة :

هي عملية تحدث داخل الخلايا بشكل عفوي او غير متخصص والتي يتم من خلالها ابتلاع وتحطيم الميكروبات ، الخلايا التالفة ، الخلايا السرطانية و المواد الدقائقية بواسطة الخلايا البلعمية المحترفة (خاصة البلاعم الكبيرة ، العدلات والخلايا الشجيرية و الخلايا البائية قبل تنشيطها) ، وكذلك تتم البلعمة بواسطة الخلايا البلعمية غير المحترفة (مثل الخلايا البطانية والظهارية)حيث تعتبر من آليات الاستجابة المناعية العفوية في حماية الجسم ، حيث انها لا تدافع عن الجسم بهضم الميكروبات فقط وإنما تعمل على ازالة الفضلات الخلوية والمادة الدقائقية التي تنشأ عن الوظائف الفسلجية الطبيعية للجسم

2-خطوات عملية البلعمة Steps of phagocytosis

تتمثل عملية البلعمة بعدة خطوات وهي :

أ-الانجذاب الكيميائي Chemotaxis

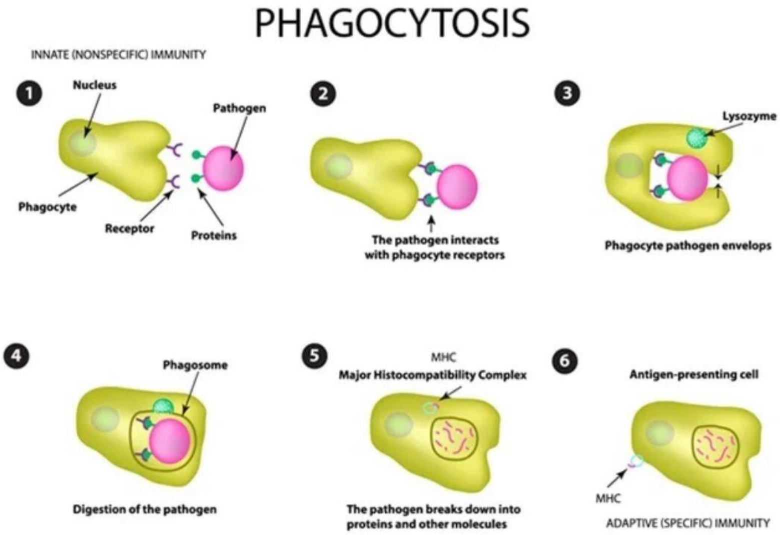
ب- الاستساغة Opsonization والتصاق الميكروب بالخلية البلعمية.

ت-ابتلاع الميكروب وتكوين الجسيم البلعمي Phagosome.

ث-اندماج الجسيم الحال مع الجسيم البلعمي وتكوين الجسيم البلعمي الحال Phagolysosome complex، ومن ثم قتل الميكروب Killing بواسطة الوسائل المعتمدة وغير المعتمدة على الأوكسجين.

ج-طرح المخلفات الناتجة عن تحطيم الميكروب الى الخارج بواسطة الاخراج الخلويExocytosis ، وكما هو موضح في الشكل(27) . يمكن الكشف عن

عمليـة البلعمـة بواسطة بلعمـة دقـائق ذرات الكـاربون ، استخدام صـبغة NBT وبلعمتـها من قبل الخلايا البلعميـة ، بلعمـة البكتريـا والفطريـات وكـذلك استخدام الثايمدين المشع .



الشكل (27): خطوات عملية البلعمة .

3- عملية البلعمة باستخدام صبغة Nitro blue tetrazolium(NBT)

أ-المواد المستعملة:

- صبغة Nitro Blue Tetrazolium (الشكل 28).
- دم طري fresh   Blood محفـوظ فـي انابيـب حاويـة علـى مـانع التخثرEDTA.
- صبغة كمزاGiemsa stain .
- شرائح زجاجية Glass slides وأغطية الشرائح Cover slides.
- محقنة لسحب الدم.
- حاضنة Incubator .

- انابيب طرد مركزي Centrifuges tubes .



الشكل (28): صبغة NBT المستخدمة في الكشف عن عملية البلعمة .

ب-طريقة العمل:

1-يحضر 0.1% من الصبغة بأذابة 0.1 غم من الصبغة في 100 مل من محلول الملح الوظيفي.

2-يمزج 0.1 مل من الصبغة مع 0.1 مل من الدم.

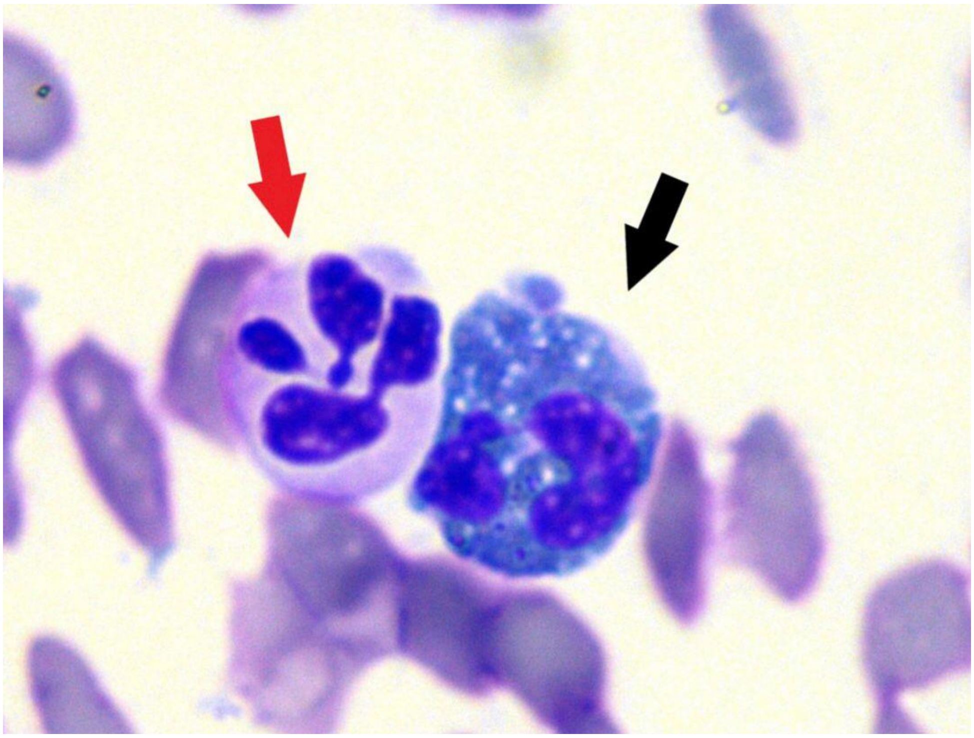
3-يحضن مزيج الدم والصبغة بدرجة حرارة 37° لمدة 10 دقائق.

4-يتم عمل مسحات من المزيج (اتباع طريقة تحضير مسحة الدم) على شرائح زجاجية ، ثم تصبغ المسحة بصبغة كميزا لمدة 2-3 دقائق ، بعدها تغسل الشريحة بعناية باستخدام ماء الحنفية ، ومن ثم تجفف .

5-تضاف قطرة من الزيت Oil immersion على الشريحة وتغطى بغطاء الشريحة Cover slide، بعدها تفحص الشرائح تحت المجهر بقوة تكبير العدسة الزيتية 100 X ، ويلاحظ تكون مادة الفورمازان داخل الخلايا العدلة Neutrophils.

6- تكون صبغة NBT صفراء اللون في حالة التأكسد ولكن عند مزجها مع

الدم وبعد فترة الحضانة فأن الخلايا البلعمية في الدم سوف تبتلع الصبغة وتختزلها وتحولها الى حبيبات بنفسجية مسودة تعرف بحبيبات الفورمازان Formazan و تتموضع في سيتوبلازم الخلية الملتهمة ، وكما هو موضح في الشكل(29).



الشكل(29): البلعمة باستخدام صبغة NBT ، حيث يمثل السهم الأسود البلعمة الى هذة الصبغة ، أما السهم الأحمرفهويمثل خلية بلعمية طبيعية .

زيادة الحمضات Eosinophilia

1-الهدف:

معرفة معنى زيادة عدد الخلايا الحمضة وماهي الخلايا المشاركة فيها وأسباب حدوث تلك الزيادة .

يمكن تعريف زيادة الحمضات بتواجد اكثر من 400 خلية / مايكروليتر من الدم وان آلية حدوث هذه الزيادة غير مفهومة ويمكن الكشف عنها عرضيا اثناء فحص مسحات الدم المصبوغة. ان الخلايا الحمضة (Eosinophils) تشبه خلايا العدلة (Neutrophils) غير ان حبيباتها تصطبغ بلون احمر براق وهي خلايا ملتهمه ولكنها اقل كفاءة من العدلات حيث تلتهم معقدات الضد والمستضد وتهاجم الديدان وحتى اليافعات من المنشقات *Schistosoma* . هناك حمضات نشطة توجد في المرضى والتي تتميز بفقدانها للتحبب وتكوين الفجوات داخل البروتوبلازم ، أما الحمضات غير النشطة فهي تتواجد في الاسوياء من الناس.

2-الاساس العلمي:

تحدث زيادة الحمضات نتيجة للأسباب التالية:

أ-عدوى الطفليات مثل الابتدائيات (protozoa) و الديدان (Helminthes) مثل

Ascaris Entrobius vermicularis, neacator,Trichuris trichura

الفطريات (fungi) مثل *Aspergillus fumigates*

ب-حالات الارجية مثل : الربو القصبي ، استنشاق ابواغ الفطريات ،

امراض جلدية مثل الجرب و التهاب الجلد الاستشرائي .

ت-الخمج البكتيري.

ث-عدوى التهاب الكبد الفيروسي المزمن (Chronic hepatitis) .

ج-الامراض السرطانية الخبيثة.

ح-عضات الحشرات.

3-المواد المستخدمة :

أ-مجهر ضوئي.

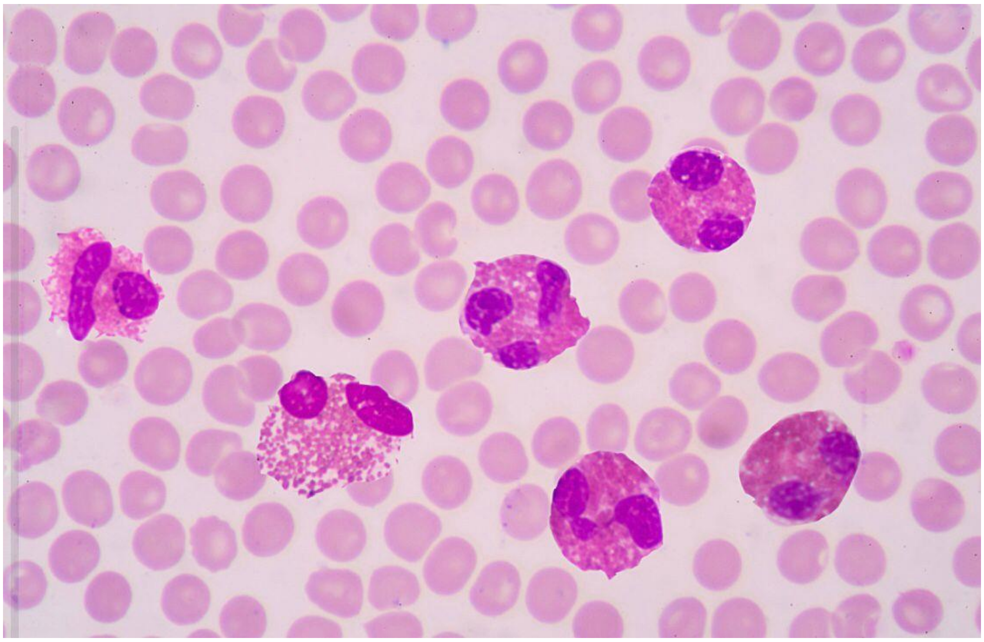
ب-شرائح زجاجية نظيفة وأغطية الشرائح الزجاجية.

ت-دم طري مؤخوذ من شخص مصاب بالديدان الطفيلية أو مصاب بألتهاب الجلد الأستشرائي ومحفوظ في أنابيب حاوية على مانع التخثر EDTA.

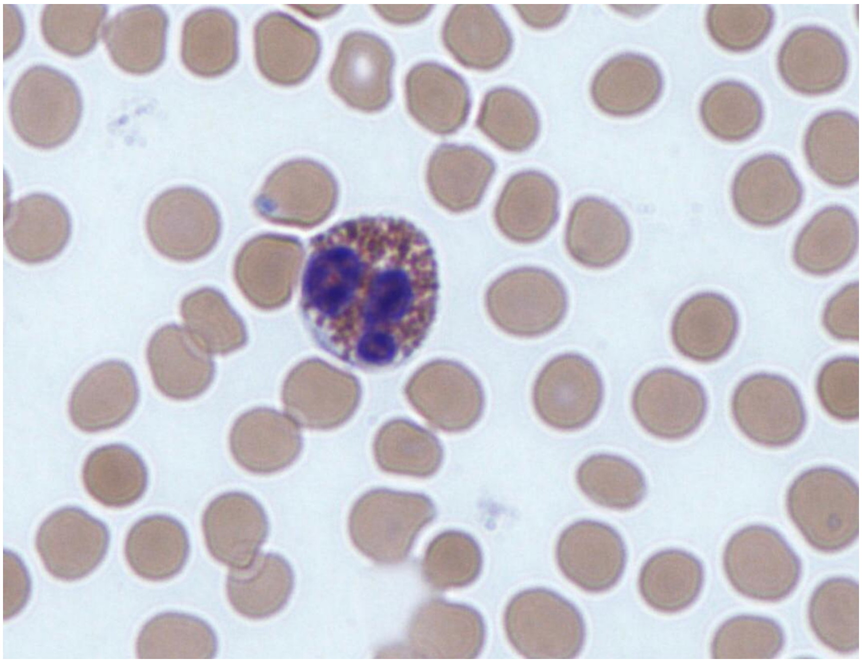
4-طريقة العمل:

أ-يتم اتباع طريقة تحضير مسحة الدم على شرائح زجاجية ، ثم تصبغ المسحة بصبغة كيمزا لمدة 2-3 دقائق ، بعدها تغسل الشريحة بعناية باستخدام ماء الحنفية ، ومن ثم تجفف .

ب-تضاف قطرة من الزيت Oil immersion على الشريحة وتغطى بغطاء الشريحة Cover slide، بعدها تفحص الشرائح تحت المجهر الضوئي بقوة تكبير العدسة الزيتية X 100 . يوضح الشكل (30) زيادة الحمضات ، في حين يبين الشكل (31) قلة الحمضات .



الشكل(30): زيادة الحمضات Eosinophilia .



الشكل (31): قلة الحمضات Eosinopenia .

تحضير المستضدات Preparation of antigens

1-الهدف:

معرفة الطرق الاساسية المستخدمة في تحضير بعض المستضدات المهمة من الناحية الطبية مثل مستضدات كريات الدم الحمر و بعض المستضدات البكتيرية.

2-الاساس العلمي:

ان من أبسط منهجيات تحضير المستضدات هي تحضير المستضدات الخلوية الكاملة مثل تحضير مستضدات كريات الدم الحمر او المستضد الجسمي للخلية البكترية، حيث تتطلب عملية تحضير هذة المستضدات جمع وغسل وتحديد الاعداد ثم تثبيت الفعل الحيوي و من ثم اثبات اختبار العقمة Sterility test.

3-طريقة تحضير مستضدات كريات الدم الحمر للأنسان:

أ-تسحب كمية 5 مل من الدم من الوريد العضدي وتوضع في أنبوبة معقمة حاوية على مانع التخثر.

ب-يمزج الدم مع مانع التخثر، ثم يؤخذ كمية 2 مل منه ويرسب باستخدام جهاز الطرد المركزي بسرعة 2500 دورة/دقيقة.

ت-يغسل راسب المكونات الخلوية بمحلول الملح الوظيفي ويطرد مركزيا" لثلاث مرات عند سرعة 2500 دورة/دقيقة.

ث-تعلق الخلايا الحمر المغسولة بحيث تشكل نسبة 5% مع محلول الملح الوظيفي المعقم.

ج-يمكن استخدامها كمستضد للتمنيع في غضون ثلاثة ايام في الثلاجة بعدها لايصلح للتمنيع في حيوان المختبر.

4-تحضير مستضدات بكتريا اشريكيا القولون *E.coli* السطحية:

أ-مزروع طري بعمر 24 ساعة من بكتريا *E.coli* على اكار مائل او طبق.

ب-يضاف 5 مل من محلول الملح الوظيفي المعقم ويجرف بعروة النمو مع المحلول الملحي ويوضع في انبوبة طرد مركزي معقمة.

ت-يتم الطرد المركزي للأنابيب لمدة 10 دقيقة عند سرعة 3000 دوره/دقيقة ثم يغسل بمحلول الملح الوظيفي المعقم لثلاث مرات.

ث-توضع الانابيب في الحمام المائي عند درجة حرارة 60 م لمدة ساعة.

ج-افحص العقمة بتخطيط طبق الأكار المغذي ، ان عدم وجود النمو البكتري يشير الى أن طريقة التحضير صحيحة، أما وجود النمو فذلك دلالة على وجود تلوث.

5-حساب عدد وحدات المستضد بوحدة الحجم:

تحسب عدد وحدات المستضد بالمقارنة المرئية مع انبوبة ماكفرلاند McFarland tube أو مع انبوبة منظمة الصحة الدولية القياسية او بأستخدام طريقة المطياف (الجدول 4).

الجدول(4): حساب عدد وحدات المستضد باستخدام قياس انبوبة ماكفرلاند McFarland standard tube .

MFU	Approximate cell density
0.5 MFU	1. 5x10^8 Cells/ ml
1 MFU	3.0 x 10^8 Cells/ ml
2 MFU	6.0 x 10^8 Cells/ ml
3 MFU	9.0 x 10^8 Cells/ ml
4 MFU	12 x 10^8 Cells/ ml
5 MFU	15 x 10^8 Cells/ ml
6 MFU	18 x 10^8 Cells/ ml
7 MFU	21 x 10^8 Cells/ ml
8 MFU	24 x 10^8 Cells/ ml
9 MFU	27 x 10^8 Cells/ ml
10 MFU	30 x 10^8 Cells/ ml

*MFU- McFarland Standard

1- تحضير المستضد الجسمي البكتيري Preparation of bacterial somatic antigen

يسمى المستضد الجسمي O antigen بجدار الخلية البكتيرية والذي يختلف من بكتريا الى أخرى ، ولذلك يمكن الأستفادة من هذة الأختلافات والتشابهات في التمييز بين الأنواع المختلفة للجراثيم المسببة للأمراض المختلفة في الأنسان . يمكن أستخدام بكتريا ***Proteus*** كنموذج لتحضير المستضدات الجسمية والسوطية وكما يلي :

أ-طريقة تحضير المستضد الجسمي O antigen :

المواد المطلوبة :

1- أنابيب اختبار حاوية على المرق المغذي المعقم Nutrient broth .

2- مزرعة حديثة من بكتريا ***Proteus*** .

3- محلول الملح الوظيفي حاوي على 0.3 % فورمالين .

4- محقنة بحجم 1 مل معقمة.

طريقة العمل :

1- ازرع هذة البكتريا في بيئة المرق المغذي ، ثم ضع الأنابيب في الحاضنة incubator بدرجة حرارة 37 مئوية لمدة 18-24 ساعة .

2- أنقل المزارع الى أنابيب الطرد المركزي المعقمة ، ثم ضعها في حمام مائي بدرجة الغليان لمدة ساعتين ونصف ، وذلك للتخلص من المستضد السوطي .

3- برد الأنابيب بوضعها في حمام مائي water bath بدرجة حرارة 45 مئوية .

4- ضع الأنابيب في جهاز الطرد المركزي لترسيب الخلايا وبسرعة 3000 دورة/ دقيقة لمدة 30 دقيقة .

5- تخلص من الراشح بواسطة ماصة باستور معقمة .

6- اغسل الخلايا الجرثومية ثلاثة مرات بمحلول الملح الوظيفي الحاوي على 0.3 % فورمالين وباستخدام جهاز الطرد المركزي .

7- علق الراسب في محلول الملح الوظيفي الحاوي على 0.3 % فورمالين لمدة 12 ساعة .

8- انقل 0.5 مل من معلق الخلايا الى أنبوب زجاجي حاوي على بيئة المرق المغذي المعقم وضعها في الحاضنة بدرجة حرارة 37 مئوية لمدة 24 ساعة .

9- تأكد من عدم تعكر بيئة المرق المغذي من خلال استخدام أختبار

التعقيم **Sterility testing** .

10-ضع المعلق المحضر في الثلاجة لحين حقنة في الحيوانات المختبرية .

ب-طريقة تحضير المستضد السوطي **Preparation of H antigen**

المواد المطلوبة :

1-مزرعة حديثة سائلة من بكتريا ***Proteus*** في بيئة المرق المغذي المعقم **Nutrient broth** ويعمر 24 ساعة.

2-أنابيب أختبار حاوية على المرق المغذي الفورمالين المعقم .

3-محلول الملح المائي على 0.6 % ملح طعام في الماء المقطر.

4- محلول الملح الوظيفي الحاوي على 0.3 % فورمالين .

5-محقنة بحجم 1 مل معقمة.

طريقة العمل :

1- لقح الأنابيب الحاوية على بيئة المرق المغذي بكتريا ***Proteus*** ، ثم ضع الأنابيب في الحاضنة بدرجة حرارة 37 مئوية لمدة 18-24 ساعة .

2- أضف الى المزارع حجم مساوي لحجم المزرعة من المحلول الملحي الذي يحتوي على 0.6% فورمالين ، حيث يستعمل الفورمالين بهذا التركيز لقتل الخلايا الجرثومية من خلال تكسير جدرانها دون أن يؤثر على المستضد الجسمي H.

3- أترك الانابيب بدرجة حرارة الغرفة لمدة ثلاثة أيام .

4- خذ 0.5 مل من المزرعة المضاف اليها المحلول الملحي الحاوي على الفورمالين ثم ضعها في انبوبة أختبار حاوية على المرق المغذي المعقم .

5- ضع الأنابيب في الحاضنة بدرجة حرارة 37 مئوية لمدة 24 ساعة .

6- تأكد من عدم تعكر بيئة المرق المغذي من خلال استخدام أختبار التعقيم Sterility testing.

7- ضع الأنابيب في جهاز الطرد المركزي بسرعة 3000دورة/دقيقة لمدة نصف ساعة .

8- تخلص من الراشح بسكبة وسحبة .

9- علق الراسب في 100مل من المحلول الملحي المضاف الية 0.3% فورمالين .

10-ضع الأنابيب في الثلاجة لحين أستخدامها في حقن الحيوانات المختبرية .

المساعدات المناعيةImmunological adjuvants

المقدمة :

هي مواد تمزج مع المستضد عند حقنة وبذلك تعزز القدرة التمنيعية لذلك المستضد ، وبشكل عام فأن المساعد المناعي يستخدم لتعزيز الاستجابة المناعية عندما يكون المستضد ذات قدرة تمنيعية واطئة ، أو عندما تكون كمية المستضد قليلة . أن المساعد المناعي يعزز الاستجابة المناعية من خلال:

1-يؤخر من بقاء المستضد في منطقة الحقن من خلال بطئ تحرير المستضد وزيادة حجمة .

2-يعزز أنتاج الحركيات الخلوية من قبل البلاعم الكبيرة مما يؤدي الى تنشيط الخلايا التائية المساعدة ومن ثم تحفيز الجهاز المناعي .

3-يحفز تكوين الورم الحبيبيgranuloma .

الاساس العلمي:

يمكن ان يستند عمل المساعدات المناعية الى عدة تفسيرات منها:

1-الاسراع و الزيادة في نشاط الخلايا المقدمة للمستضد عن طريق الخلايا التائية و البائية.

2-تغيير طبيعة المستضد و تغيير هيئته.

3-التخلص من ظاهرة التحمل المناعي.

4-تحفيز الخلايا البائية و التائية.

تقسم المساعدات المناعية الى نوعين:

1-مساعد فرويند الكامل Freunds complete adjuvants

يتكون من محلول دهني حاوي على كمية من عصيات السل Tubercle bacilli المقتولة بالحرارة، وعند حقنة في الجلد يساعد على تكوين الأضداد ، الا ان استعمالة محظور في الانسان وذلك لانه يؤدي الى تكوين الورم الحبيبي granuloma في منطقة الحقن.

2-مساعد فرويند غير الكامل Incomplete freunds adjuvant :

يتكون هذا المساعد من معلق دهني ، أملاح الكالسيوم ، الالمنيوم والسيليكا ، اذ تستعمل هذه الاملاح كمساعدات مع المستضد في الانسان أكثر من غيرها .

المواد المستخدمة:

1-زيت معدني او زيت نباتي سائل.

2-ماء ملح وظيفي.

3-معلق بكتريا التدرن Suspension of *Mycobacterium tuberculosis*.

4-محاقن طبية نبيذة .

5- انبوبة قطرها 1 ملم شفافة طولها 15-10 سم ذات طبيعة بلاستيكية.

طريقة العمل :

أ-تحضير مساعد فرويند غير الكامل:

1- يسحب بواسطة محقنة طبية معقمة 3 مل من الزيت السائل.

2- يسحب بواسطة محقنة طبية معقمة 3 مل من الماء المقطر او ماء الملح الوظيفي.

3-يتم ازالة الابر من المحقنتين.

4-تربط الانبوبة الشفافة بنهاية محقنة الزيت و نهاية محقنة الماء.

5-يدفع الزيت الى محقنة الماء مرة و من ثم يدفع الماء الى محقنة الزيت مرة اخرى بشكل مستمر لحين الحصول على مستحلب متجانس.

ب-تحضير مساعد فرويند الكامل:

1-يسحب بواسطة محقنة طبية معقمة 3 مل من الزيت السائل.

2- يسحب بواسطة محقنة طبية معقمة 3 مل من الماء المقطر او ماء الملح الوظيفي.

3- يتم ازالة الابر من المحقنتين.

4- تربط الانبوبة الشفافة بنهاية محقنة الزيت و نهاية محقنة الماء.

5- يدفع الزيت الى محقنة الماء مرة و من ثم يدفع الماء الى محقنة الزيت مرة اخرى بشكل مستمر لحين الحصول على مستحلب متجانس.

6- يؤخذ 5 مل من العالق البكتيري(المستضد) في محقنة و 5 مل من المستحلب بمحقنة ويتم مزج الحجمين كما مذكور في نقطة (5) لعدة مرات فيكون الخليط جاهزا للحقن.

ملاحظات:

- عند حقن حيوان المختبر يجب ان يكون مساعد فرويند غير الكامل و مساعد فرويند الكامل مستحلب ذو عكوره منتظمة.
- مساعد فرويند هو مستحلب غير مستقر يحضر عند الحاجة الية ،ويوصى بالرج المتواصل للتحضير عند التأخر في استعماله.

بروتينات الطور الحاد Acute phase proteins(AFPs)

1- المقدمة :

عند دخول مستضد ما (ممنع) الى جسم الانسان أو الحيوان المختبري فانه سوف يبتلع من قبل الخلايا البلعمية مثل البلاعم الكبيرة والخلايا الشجيرية والخلايا وحيدة النولة الدموية وغيرها ، مما يحفزها على افراز الحركيات الخلوية الالتهابية مثل IL-1β ، IL-6 و TNF-α في مواقع الالتهاب ، وهذة المواد المفرزة تحفز خلايا الكبد hepatocytes على افراز بروتينات الطور الحاد acute phase proteins التي هي عبارة عن مكونات مصلية طبيعية أذ تزداد بسرعة وعلى الأقل بنسبة 25% في حالات الخمج ، الجروح والكلم trauma خلال 12 - 24 ساعة استجابة الى افراز الحركيات الخلوية أعلاه و توصف هذا البروتينات بميلها للتفاعل مع أيونات الكالسيوم Ca^{++} . أن الحركيات الخلوية ترفع من درجة حرارة الجسم مما يساعد في أزاله الأخماج ، أذ أن تأثيرها الأساس هو على غدة تحت المهاد hypothalamus لذلك يتغير تنظيم درجة حرارة الجسم مما يؤثر على الخلايا العضلية و الدهنية ، و يؤدي ذلك الى تحريك الطاقة و زيادة درجة حرارة الجسم مما تقلل من قابلية البكتريا والفايروسات على التضاعف و كذلك فأن الاستجابة المناعية التكيفية تعمل بفعالية أكثر. هنالك نوعين من بروتينات الطور الحاد تسمى الاولى بروتينات الطور الحاد الالتهابية الأوليةpro-inflammatory AFPs والتي تتمثل بالبروتين التفاعلي – سي(CRP) ، اللكتين الرابط للمانوز mannose-binding lectin(MBL) و البروتينات السطحية الرئوية

pulmonary surfactant proteins وغيرهـا ، أمـا الثانيـة فسـمى ببروتينات الطور الحاد المضادة للألتهاب للالتهاب anti- inflammatory AFPs والتـي تتضـمن مولـد الليفـين Fibrinogen ، نظيـر النشـا المصـلي Serum amyloid- A(SAA) ، Haptoglobin ، Ceruloplasmin ، alpha 1 – antitrypsin و $\alpha 2$ – Macroglobulin .

ان أكثر بروتينات الطور الحاد شيوعا" والتي يوصى بتقدير مستوياتها فـي حـالات الالتهـاب (الأخمـاج و الضـرر النسـجي كـالجروح والرضـوض) هـو بروتين الطور الحاد الالتهابي المسمى بالبروتين التفاعلي – سي(CRP) .

2-أسباب ارتفاع مستوى CRP :

أ-التعرض الى بعض أنواع الحروق.

ب-النوبات القلبية وخاصة النوبة القلبية الثانية.

ت-الأصـابة بـبعض الأخمـاج الرئويـة مثـل الاصـابة ببكتريـا التـدرن *Mycobacterium tuberculosis* .

ث-التعرض الى بعض الصدمات .

ج-التعرض الـى بعض الأمـراض الالتهابيـة المزمنـة مثل داء الذئبـة الاحمـراري الجهـازي systemic lupus erythematosus(SLE) ومرض التصلب المتعدد multiple sclerosis(MS) وغيرها من الأمراض.

ح-الاصابة ببعض الاورام الخبيثة .

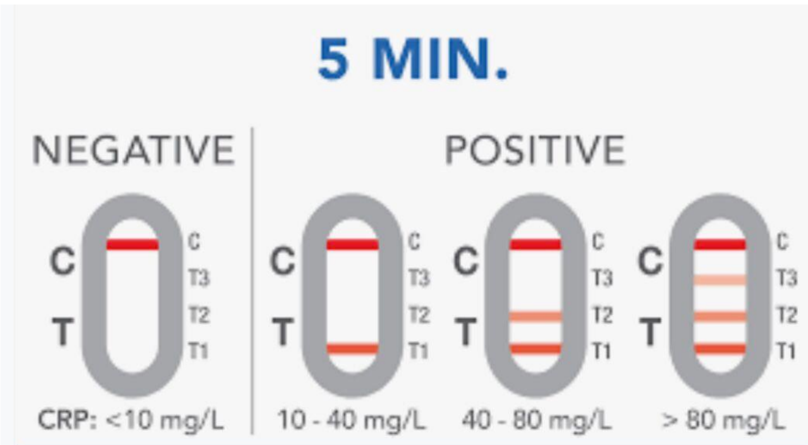
خ- الاصـابة بـأمراض المعـي الالتهـابي Inflammatory bowel diseases(IBD) .

طريقة عمل تقدير مستوى CRP :

يتم أجراء هذا الأختبار وذلك بسحب عينة من الدم من الوريد في ذراع الفرد ، ومن ثم توضع العينة في انبوبة الاختبار من اجل تحليلها ، وهنالك طريقتين لتقدير مستوى ذلك البروتين الاولى هي بواسطة عدة الاليزا (الشكل32)، أما الثانية فهي الفحص اليدوي باستخدام عدة خاصة(الشكل 33).



الشكل(32): عدة الاليزا المستخدمة في تقدير مستوىCRP .



الشكل(33): العدة اليدوية المستخدمة في تقدير تركيزCRP .

3-نتائج تحليل مستوى CRP :

ان المستوى الطبيعي الى CRP في الانسان هي أقل من 10ملغم/ لتر ، في حين اذا كان التركيز اعلى من 10ملغم/ لتر فهذة دلالة على وجود خمج بالجراثيم ، صدمة أو أمراض مزمنة ، ومن هذة الأمراض المزمنة ارتفاع ضغط الدم وداءالسكري ، أما اذا تراوح المستوى بين 10-100ملغم/ لتر فهو يشير الى وجود ارتفاع متوسط ووجود التهاب معين دون تحديد المكان ، بينما اذا ارتفع المستوى عن 100ملغم/ لتر فهذا يشير الى وجود التهاب خطير وخاصة العدوى الجرثومية .

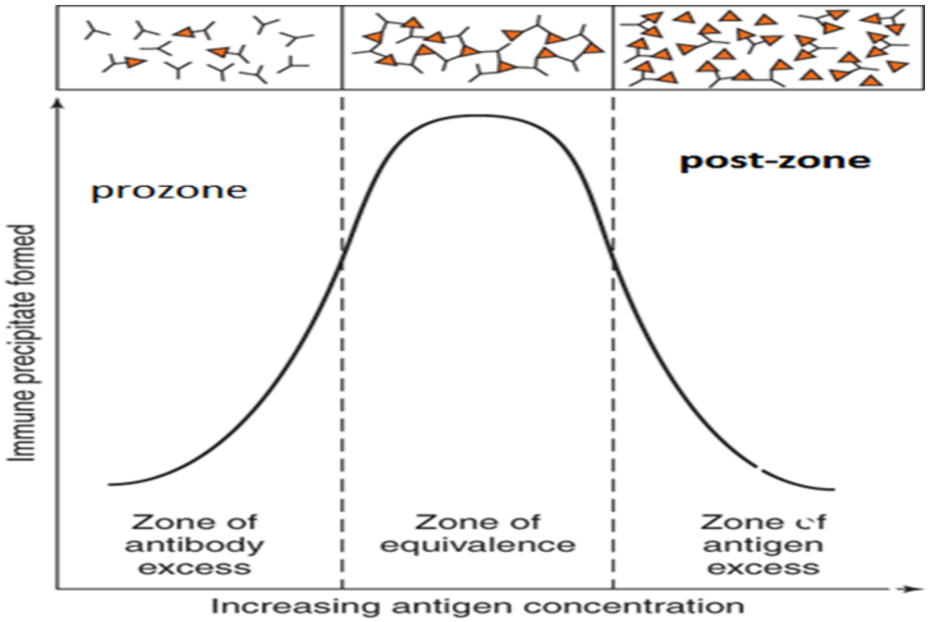
المظاهر المشتركة للتفاعل المصلي بين المستضد والجسم المضاد

1- المقدمة :

ان ارتباط المستضد Antigen مع الجسم المضاد الخاص به Specific Antibody ينتج عنه تكوين معقد يسمى المعقد المناعي immune complex ، وهنالك عدد من المظاهر المشتركة في التفاعلات المصلية وهي :

أ-وجود تناسب كمي امثل بين عدد الذرى المستضدية بوحدة ثابتة من الحجم من المستضد مع عدد مستقبلات الذرى المستضدية في وحدة ثابتة من حجم الضد وتقسم هذه الى نطاق و قبل النطاق و بعد النطاق كما في الشكل ادناه(الشكل34).

Curve precipitation



الشكل(34): التناسب الكمي في التفاعل بين المستضد والجسم المضاد .

ب- حصول التفاعلات المصلية عند دارئ مناسب .

ت- زيادة درجة الحرارة تزيد من سرعة التفاعل شرط الا يؤدي ارتفاع الحرارة الى تلف البروتين.

ث- التفاعل بين الضد و المستضد ديناميكي حيث ينفصل الضد عن المستضد عند تخفيف احد المتفاعلات .

ج- طبيعة تكافؤ الضد و المستضد المتفاعلين.

ح- حساسية المعقد(ضد-مستضد) للمتمم.

خ- طريقة اجراء الفحص و الدقة في اجراء الخطوات.

2-انواع التفاعلات بين المستضد والجسم المضاد:

أ-تفاعلات التلازن Agglutination reactions

ب-تفاعلات الترسيب Precipitation reactions

ت- اختبار تثبيت المتمم Complement fixation test

ث-المقايسة الأمتصاصية المناعية للأنزيم المرتبط Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

ج- اختبار التالق المناعي Immunofluorescence (IM) assay

تفاعلات التلازن Agglutination reactions

1-الهدف من هذا الاختبار :

يهدف هذا الاختبار الى معرفة اهمية اختبار التلازن و انماطه و تقنياته، حيث يعتبر التلازن من التفاعلات المصلية والتي ينتج عنها تكتل الجسيمات الناتجة عن تفاعل المستضد مع الضد المتخصص به تحت ظروف قياسية ويشترط بالمستضد ان يكون حبيبي غير ذائب، ويرافق هذا التفاعل المصلي الظواهر التالية:

ا-التلازن المشترك Cross agglutination

ب- الفعل التحجيمي Masking effect

ت- التلازن الذاتي Auto agglutination

ث-التلازن غير نوعي Non-specific agglutination

ج- ظاهرة النطاق Zonation

2-انماط التلازن:

هنالك عدة أنماط للتلازن وهي كما يلي :

أ-التلازن المباشر Direct agglutination

ب- التلازن الميكروبي Microbial agglutination

ت-التلازن الدموي Haemagglutination

ث-التلازن الدموي النظير Isohaemagglutination

ج- تلازن اللاتكس Latex agglutination

ح- التلازن البارد Cold agglutination

3-تطبيقات اجراء اختبار التلازن:

أ- التشخيص المصلي للإصابة الميكروبية Serodiagnosis of microbial infection.

ب- تشخيص مجاميع الدم Blood groups .

ت- التحري عن البروتين الفعال- سي (CRP) عند الاصابة الميكروبية.

ث- تشخيص اصابة مرض احادي النواه الخمجي Mononucleosis infection

ج- تشخيص الاصابة بمرض ذات الرئة و المايكوبلازما Atypical pneumonia ,mycoplasma infection.

ح-اختبار الحمل Pregnancy test

4-الاساس العلمي لأختبار التلازن :

تفاعل المستضد الجسمي مع الضد المتخصص به تحت ظروف التفاعل المصلي القياسية ووفق المظاهر المشتركة للتفاعل المصلي.

5-المواد المستخدمة في هذا الاختبار :

أ-أمصال – مستضدات.

ب-محلول ملحي طبيعي.

ت-شرائح زجاجية أو بلاستيكية ذات حفر.

ث-انابيب تلازن مع مسند الأنابيب .

ج- ماصة دقيقة Micropipette.

6-طرق عمل هذا الاختبار:

أ-طريقة تلازن الشريحة:

1- نأخذ قطرة من المستضد و توضع على شريحة زجاجية نظيفة.

2- نأخذ قطرة بذات الحجم من المصل و توضع بجانب القطرة السابقة.

3- نمزج القطرتين(قطرة المصل+ قطرة المستضد) بعيدان خشبية تستخدم عادة في الفحوص المصلية .

4- تحضير مصل قياسي يعطي نتيجة موجبة و اخر يعطي نتيجة سالبة لغرض المقارنة.

ب-طريقة تلازن الانبوبية:

1- تجرى تخافيف عشارية ثنائية للمصل.

2- يضاف مقدار 0.5 مل من المستضد الى الانابيب الحاوية على المصل المخفف.

3- تمزج الانابيب جيدا و تحضن بدرجة حرارة 37 درجة مئوية لمدة 8 ساعات الى يوم كامل.

7-النتائج:

أ-نتيجة التلازن في الشريحة:

1- زمن ظهور التلازن.

2- حجم اللزائن.

3- طبيعة اللزائن.

ب-نتيجة التلازن في الانبوبة:

1- نسبة التلازن لباقي حجم المتفاعلات.

2-العيار:مقلوب اعلى تخفيف يعطي نتيجة موجبة.

3- فترة الحضانة ودرجة الحرارة.

8-الاستنتاج و الملاحظات:

1- النتيجة موجبة.

2-النتيجة الموجبة الكاذبة.

3- النتيجة السالبة.

4- النتيجة السالبة الكاذبة.

5- النطاق.

6-مؤشر الحساسية و مؤشر التخصص.

اختبار ويدال Widal test

1-المقدمة :

يعتبر اختبار ويدال من الامثلة التطبيقية لاختبار التلازن ، حيث يتم استخدام مستضدات قياسية للتحري عن الاضداد المتخصصة لبكتريا السالمونيلا في مصول المرضى المصابين بالحمى التايفوئيدية Typhoid fever والحمى الباراتيفوئيدية Paratyphoid fever ، اذ انه يكشف عن الاجسام المضادة المتخصصة ببكتيريا *Salmonella* في حالة الاصابة.

2-طرق أجراء الأختبار :

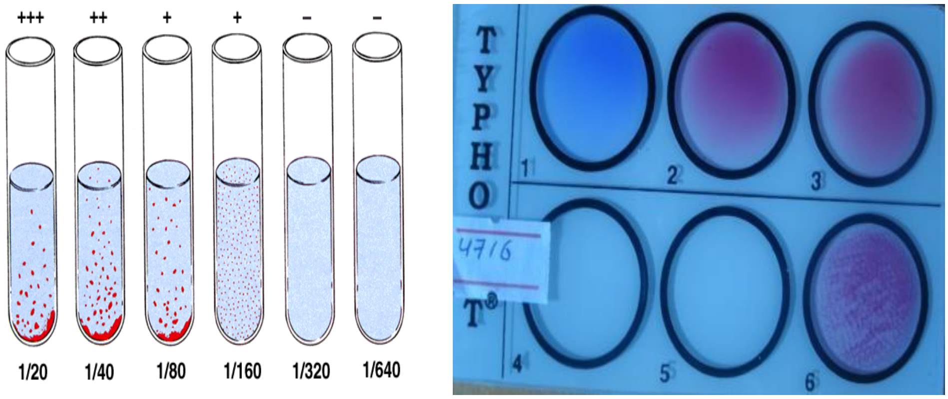
هناك طريقتين لأجراء الاختبار وهما :

أ-طريقة تلازن الشريحة Slide Agglutination test :

وهي طريقة نوعية Qualitative حيث تستعمل لمعرفة نوع الاصابة ولكنها لا تحدد شدة الاصابة.

ب-طريقة التلازن بالأنبوب Tube Agglutination test

وهي طريقة كمية Quantitative تستعمل لمعرفة تركيز الاجسام المضادة في مصل المريض ، حيث يخفف المصل بطريقة التخفيف المتسلسل وتضاف اليه كمية من المستضد وتؤخذ النتيجة كمقلوب اعلى تخفيف يعطي نتيجة ايجابية او ما يسمى بالعيار Titer، وكما هو موضح في الشكل (35) .



الشكل(35): اختبار ويدال يوضح التلازن بالشريحة والأنابيب لبكتريا السالمونيلا .

طريقة العمل لأختبار تلازن الأنابيب :

1- يسحب 5 مل من الدم الوريدي الى المشتبه به بالاصابة ويوضع في انبوبة الطرد المركزي والتي توضع على حامل أنابيب لكي يتم بعدها فصل المصل .

2- تستعمل لكل فحص 8 أنابيب لكل مجموعة.

3- ضع في كل مجموعة من الانابيب 0.5 مل من المحلول الملحي الطبيعي مبتدءا″ من الانبوب رقم 2 الى 8.

4- حضر في انبوبة اختبار رقم 1 التخفيف 1:10 من مصل الشخص في المحلول الملحي الطبيعي .

5- انقل 0.5 من المصل المخفف لكل من الانبوبة رقم 1 الى الانبوبة رقم 2 في مجموعة الانابيب .

6- امزج الخليط في انبوب رقم 2 ، ثم انقل منه 0.5 مل الى الانبوبة رقم 3 .

7- امزج الخليط في الانبوبة رقم 3 جيدا" ثم انقل منه 0.5 مل الى الانبوبة رقم 4 ، واستمر في هذة الخطوات المكررة حتى الانبوب رقم 7 .

8- اسحب 0.5 مل من خليط الانبوب رقم 7 واتركه .

9- ان الانابيب من رقم 1 الى رقم 7 تحتوي على 0.5 مل من التخافيف المضاعفة للمصل (1:10، 1:20، 1:40 ، 1:80 ، 1:160 ، 1:320، 1:640) عدا الانبوبة رقم 8 التي تحتوي على 0.5 مل من المحلول الملحي الطبيعي فقط والتي تمثل عينة السيطرة .

10-أضف الى كل انبوبة 0.5 مل من المعلق الجرثومي بما في ذلك انبوبة السيطرة .

11- ارفع حامل الانابيب برفق وحاول ان تمزج محتويات الانابيب من خلال تحريكة الى الامام والخلف عدة مرات .

12- ضع الانابيب في حمام مائي بدرجة حرارة 55 مئوية لمدة 2-3 ساعات بالنسبة الى المستضد السوطي الجرثومي H ولمدة 6-12 ساعة الى المستضد الجسمي O (الشكل36).

13- تقرأ النتائج بالعين المجردة وباستعمال ضوء قوي وحاول عدم تحريك الانابيب اثناء القراءة .

14- سجل عيار الاجسام المضادة Titer الموجودة في مصل الشخص وذلك بتسجيل اكبر تخفيف للمصل حدث به التلازن .



الشكل(36): عدة اختبار فحص ويدال Widal test kit .

اختبار الروز بنكال Rose Bengal test

1-المقدمة :

هو اختبار يستخدم للكشف عن العدوى التي تصيب الأنسان نتيجة اصابته ببكتريا *Brucella* ويسمى المرض بالحمى المالطية Brucellosis ، حيث تصيب تلك الحمى المواشي وخاصة الأغنام ، الماعز ، الغزلان ، والخنازير وكذلك من الممكن أن تصيب الجمال والجواميس . تنتقل البكتريا المسببة للمرض من الحيوان المصاب الى الأنسان ، ويحدث ذلك بسبب الأساليب غير الصحية في التعامل مع تلك الحيوانات وهي :

1- تناول الحليب غير المعقم (غير المبستر) المأخوذ من الحيوان المصاب .

2- دخول البكتريا المسببة للمرض عن طريق جرح أو تلوث غشاء ملتحمة العين عند التعرض الى افرازات الحيوان .

3- استنشاق الرذاذ الملوث بالبكتريا المسببة للمرض من أماكن تواجد الحيوانات المصابة .

تؤدي الأصابة بالحمى المالطية الى العديد من الأعراض المميزة لها ، ومن هذة الأعراض :

أ-ارتفاع درجة الحرارة مع تعرق شديد خصوصا" في الليل ، حيث تظهر وتختفي باستمرار .

ب-الصداع .

ت-ألام في الظهر والمفاصل .

ث-الشعور بالتعب والارهاق والخمول .

ج-نقصان في الوزن .

2-تشخيص المرض:

يعتمد تشخيص المرض على العديد من العلامات السريرية الظاهرة على الشخص المصاب ، ويتم اجراء العديد من الفحوصات المختبرية للتأكد من الأصابة بالمرض وهي :

أ-العد الكلي والتفريقي لخلايا الدم البيض والذي يكون طبيعي أو منخفض قليلا" وخاصة للخلايا اللمفية .

ب-عزل البكتريا من نقي العظم من خلال زرعها في الأوساط الزرعية في المراحل المبكرة من الاصابة ، أو من الدم ، السائل النخاعي أو من العقد اللمفية .

ت-الكشف عن الضد IgG في الطور المزمن وهي دلالة على ان الاصابة بالبكتريا قديمة .

ث-الكشف عن الضد IgM في الطور الحاد وهي دلالة على ان الاصابة بالبكتريا حديثة .

ج-تقدير مستوى البروتين التفاعلي – سي (CRP) ، فحص وظائف الكبد .

ح-اجراء اختبار الروز بنكال Rose bengal test ، وهو احد اختبارات التلازن والذي يستخدم للكشف عن الاجسام المضادة المتخصصة ببكتريا *Brucella* في جسم الشخص المصاب ، وذلك باستخدام عدة خاصة (شكل37).



الشكل(37): عدة أختبار الروز بنكال Rose bengal test kit .

الفحوصات الهرمونية

اختبارهرمون مخزون المبيض (Anti–Mullerian Hormone(AMH

1–المقدمة :

هو تحليل مخزون المبيض لقياس مستويات الهرمون المضاد لمولر (AMH) الموجود في الجسم ، اذ يعتبر أحد البروتينات التي يتم تصنيعها من قبل الخلايا الحبيبية الموجودة في جريب المبيض ovarian follicle ، حيث توجد علاقة طردية بين نسبته ومستوى الخصوبة لدى المرأة ، فكلما كانت نسبته أعلى دل ذلك على أرتفاع عدد البويضات في الجسم .

2–الهدف من اجراء هذا الاختبار :

يعتبر تحليل نسبة الهرمون المضاد لمولر AMH الذي تفرزه الجريبات الغارية في الدم إحدى الطرق المعتمدة لتقييم الخصوبة عند المرأة، كما أنّ معرفة مستوى هذا الهرمون يساعد الطبيب في اختيار الجرعات المناسبة من الدواء لعلاج المشاكل المختلفة المتعلقة بالخصوبة عند المرأة، خاصةً عند الخضوع لعملية التلقيح في المختبر وهو مايعرف بأطفال الأنابيب In vitro fertilization .

3–الاساس العلمي للأختبار :

يتم اجراء هذا الفحص باستخدام طريقة الاليزا وايضا يمكن استخدام طريقة التالق المناعي immunofluorescence assay (شكل 38).

4–فوائد اجراء الفحص:

1–تقييم سلامة المبيض العامة، احتياطي المبيض وحالة الجريبات المبيضية

خلال علاج المشاكل المتعلقة بالخصوبة.

2-تشخيص متلازمة تكيس المبايض أو ما يعرف بكسل المبيض.

3-تقييم سرطان المبيض واستجابته للعلاج أيضًا.

4-تقييم المشاكل المتعلقة بالجنين وتحديد جنس الجنين.

5-التنبؤ باقتراب سن اليأس.

6-البحث حول أسباب وعلل سن اليأس المبكر.

7-تشخيص السبب الكامن وراء تأخر الدورة الشهرية حتى العمر ١٥سنة وانقطاع الطمث بعدها.

8-تشخيص أسباب اضطرابات الدورة الشهرية لدى بعض النساء.

9-تقييم أداء الخصيتين لدى المولود الذكر.

10-معرفة سبب اختفاء الخصية عند المولود الذكر أو نقصها.

11-تشخيص أسباب بروز صفات ذكورية لدى الإناث (التذكير) كنموّ الشعر المتزايد أو خشونه الصوت وغير ذلك.

5-مستويات الهرمون حسب العمر:

1- 3.0 نانوغرام/مل في العمر 25 سنة .

2- 2.5 نانوغرام/مل في العمر 30 سنة.

3- 1.5 نانوغرام/مل في العمر 35 سنة.

4- 1 نانوغرام/مل في العمر 40 سنة.

5- 0.5 نانوغرام/مل في الأعمار الأكثر من 40 سنة.



الشكل(38): عدة فحص مخزون المبيض AMH .

6-تفسير نتائج تحليل AMH :

ان الحصول على نتائج طبيعية لتحليل AMH يشير الى أن احتياطي المبيض يعمل بشكل طبيعي في الجسم ، ولذلك يجب اجراء تحاليل اخرى في حالة عدم قدرة المراة على الحمل على الرغم من امتلاكها النسب الطبيعية للفحص AMH .

7-القيم الطبيعية لتحليل AMH :

أ-المستوى الطبيعي من 0.7-3.5 نانوغرام/مل.

ب-المستوى المرتفع أكثر من 5 نانوغرام/ مل .

ت-المستوى المنخفض هو أقل من 0.3 نانوغرام/مل.

اختبار الترسيب Precipitation test

1-الهدف :

التعرف على اختبار الترسيب وانواعه وتطبيقاته.

2-الاساس العلمي:

هو تفاعل مصلي بين مستضد ذائب soluble مع ضده المتخصص تحت ظروف التفاعل المصلي القياسية ويتكون معقد مناعي على شكل راسب Precipitant ويتم دراسة الترسيب عن طريق:

أ-انتشار المتفاعلات في وسط وعند حصول التناسب الامثل بينهما يحدث الترسيب ويكون الوسط سائلاً او هلامياً.

ب-قد يكون الترسيب في الانتشار في مجال كهربائي بالنسبة لاحد المتفاعلات ثم يضاف المتفاعل الثاني ويسمح له بالانتشار في نفس الوسط تحت تأثير المجال الكهربائي ويصل الى التناسب الامثل ثم يحدث الترسيب.

3- تطبيقات اختبار الترسيب:

أ-دراسة مستويات الاضداد وأصنافها في الحالات المرضية.

ب-التحري الوبائي عن مستضد ميكروبي محدد باستخدام ضد قياسي.

ت-التحري الوبائي عن الاضداد المتخصصة لمرض معين باستخدام مستضد معين.

ث-تحديد هوية الذيفانات الميكروبية .

ج-تحديد عدد الانظمة المستضدية – الضدية.

ح-تصنيف الاحياء المجهرية.

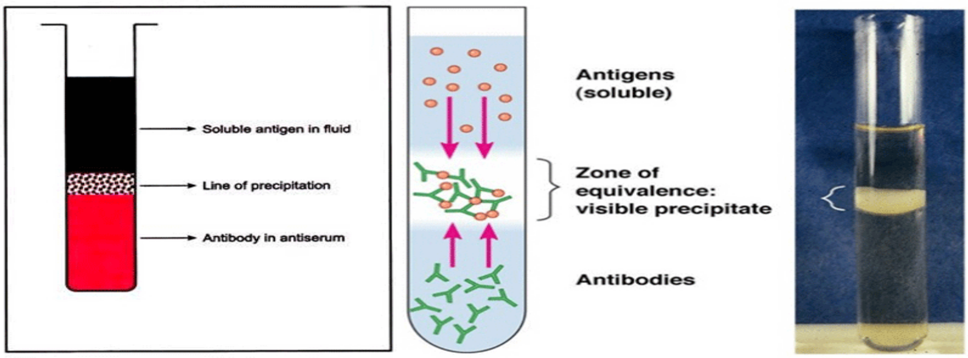
4- تقنيات الترسيب:

أ-اختبار انتفاخ المحفظة Capsular swelling test.

ب- الهجرة المناعية الكهربائية Immunoelectrophoresis

ت-اختبار التفاعل الحلقي Ring reaction test.

هو اختبار مصلي بسيط يوضح عملية الترسيب في المحاليل ، ويعتمد على اضافة كميات متساوية لتخافيف مختلفة من المستضدات الذائبة كطبقة فوق كمية متساوية من الأجسام المضادة او بالعكس بصورة تماس الطبقتين وليس مزجهما مع بعضهما ، ولذلك في منطقة وجود التكافؤ بين المتفاعلين Equivalent zone تتكون حلقة الترسيب في منطقة تماس الأضداد مع المستضدات الذائبة ، وهذا الاختبار مهم في تشخيص المستضدات والاجسام المضادة المجهولة، وكما هو موضح في الشكل (39).



الشكل(39): اختبار الترسيب الحلقي .

المواد المطلوبة لاجراء هذا الأختبار :

1- مصل أرنب يحتوي على الأجسام المضادة لمصل الأنسان .

2- مصل أرنب طبيعي .

3- مصل انسان طبيعي مخفف بنسبة 1:10 و 1:100 في محلول دارئ البوريت Borate –buffer saline .

طريقة العمل :

1- حضر عشرة أنابيب أختبار .

2- ضع على حامل الأنابيب 5 أنابيب في صفين (10 أنابيب)ورقم الأنابيب من 1 الى 5.

3- ضع في الأنبوبة رقم 1 من كل صف 0.5 ملليلتر من مصل الأرنب الذ يحتوي على الأجسام المضادة لمصل الأنسان .

4- ضع في الانبوبة رقم 2 من كل صف 0.5 ملليلتر من مصل الأرنب الذي يحتوي على الأجسام المضادة لمصل الانسان .

5- ضع في الانبوبة رقم 3 من كل صف كمية تساوي 0.5 ملليلتر من مصل الأرنب الطبيعي .

6- ضع في الانبوبة رقم 4 من كل صف كمية تساوي 0.5 ملليلتر من مصل الأرنب الطبيعي .

7- ضع في الانبوبة رقم 5 من الصف الأول كمية تساوي 0.5 مlلليلتر من 1:10 تخفيف مصل الأنسان.

8- ضع في الانبوبة رقم 5 من الصف الثاني كمية تساوي 0.5 مlلليلتر من 1:100 تخفيف مصل الأنسان.

9- أضف الى الأنبوبة رقم 1 من كل صف كمية 0.5 ملليلتر من محلول دارئ البوريت .

10-أضف الى الأنبوبة رقم 2 من الصف الأول كمية 0.5 ملليلترمن التخفيف 1:10 لمصل الأنسان .

11- أضف الى الأنبوبة رقم 2 من الصف الثاني كمية 0.5 ملليلترمن التخفيف 1:100 لمصل الأنسان.

12- أضف الى الأنبوبة رقم 3 من الصف الأول كمية 0.5 ملليلترمن التخفيف 1:10 لمصل الأنسان.

13- أضف الى الأنبوبة رقم 3 من الصف الثاني كمية 0.5 ملليلترمن التخفيف 1:100لمصل الأنسان.

14-أضف الى الأنبوبة رقم 4 من كل صف كمية 0.5 ملليلتر من محلول دارئ البوريت .

15- أضف الى الأنبوبة رقم 5 من كل صف كمية 0.5 ملليلتر من محلول دارئ البوريت .

16- اترك الأنابيب في درجة حرارة الغرفة لمدة ساعة وراقب تكون قرص حلقي والذي يمثل قرص الترسيب في الطبقة بين السطحين .

ان الانبوب الذي يحتوي على أكبر ترسيب تكون نسبة تخفيف المستضد الى نسبة الأجسام المضادة الموجودة متكافئة ، وهذا ما يدعى بمنطقة التكافئ Equivalent zone.

الترسيب في هلام الاكار Precipitation in Agar Gel

والتي تشمل مايلي :

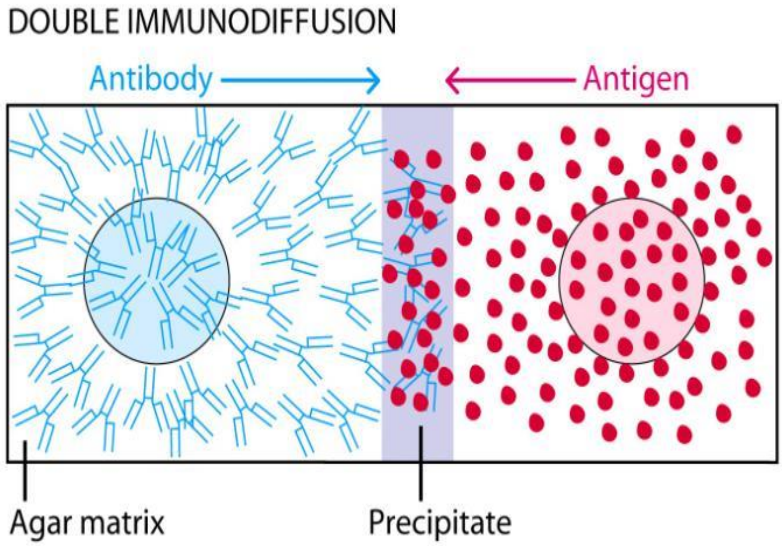
أ- طريقة الانتشار المناعي الثنائي Double immunodiffusion Method

يسمى هذا الأختبارأيضا″ بالأنتشار الثنائي بطريقة أوكترلوني Ouchterlony double diffusion . يستعمل هذا الأختبار للحصول على تراكيز مناسبة من المستضد الذائب لترسيب الأضداد النوعية له ، وكذلك يستعمل في ترسيب عدد من المستضدات الذائبة والتعرف عليها فيما اذا كانت تحتوي على مستضد مشارك أم لا أو كانت متشابهة ، حيث ينتشر كلا″ من المستضد الذائب والأضداد في الأكار ويحدث خط الترسيب عندما تكون كمية الأجسام المضادة مكافئة لكمية المستضد (شكل40)، وتظهر خطوط الترسيب على شكل ثلاثة انماط (شكل 41)هي:

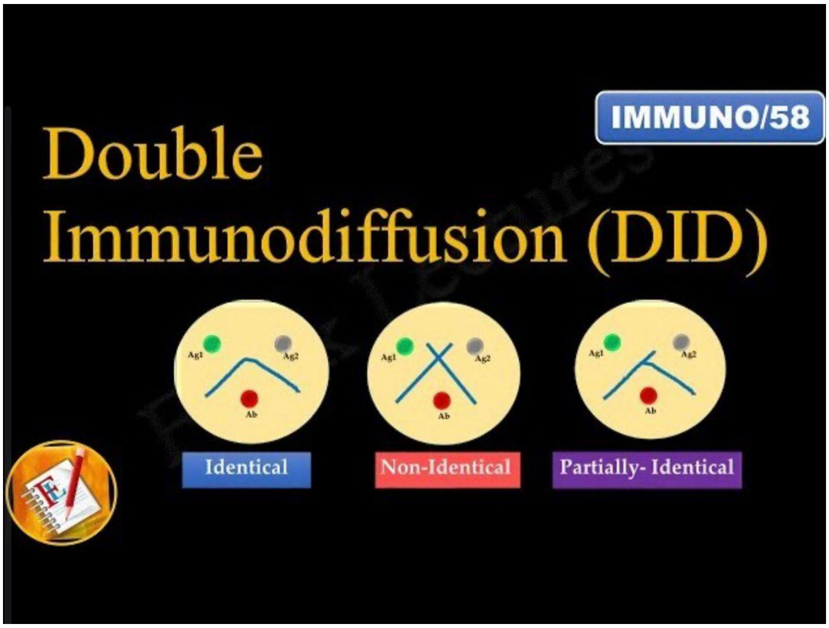
1-نمط التطابق Pattern of identity .

2-نمط عدم التطابق Pattern of non- identity .

3-نمط التطابق الجزئي Pattern of partial identity .



الشكل(40): الأنتشار المناعي الثنائي في أختبار الترسيب .



الشكل(41): أنماط خطوط الترسيب في الانتشار المناعي الثنائي .

المواد المطلوبة في هذا الاختبار:

1- مستضد ذائب أو عدد من المستضدات الذائبة .

2- أضداد مصلية متخصصة بالمستضد بتخافيف مضاعفة .

3- نوبل أكار بنسبة1% سائل في حمام مائي .

4- أوراق للرسم وكذلك قطع من القطن المبلل بالماء المقطر والمعقم.

طريقة العمل :

1-ضع أطباق البتري فوق الرسم وانقل الى الاطباق مايعادل 20 مل من أكار نوبل ، واترك الأكار لكي يتصلب في درجة حرارة الغرفة لمدة 30 دقيقة .

2-بواسطة انبوب صغير اعمل الحفر في الاكار ثم ارفع الأكار الزائد .

3-انقل 0.1 مل من المحاليل الى الحفر التي تم عملها في الأكار .

4-ضع الأطباق في وعاء زجاجي كبير   desicator مع قطنة مبللة لمنع الجفاف ولأعطاء رطوبة كافية .

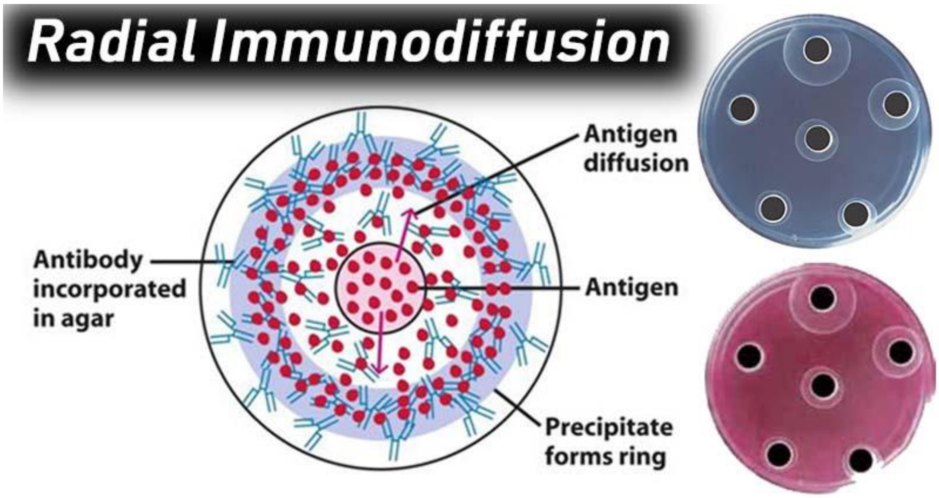
5-ضع الوعاء الزجاجي في الحاضنة بدرجة حرارة 37 مئوية لمدة 7 أيام وافحص عن وجود خط الترسيب يوميا״، وكما موضح في الشكل (42).



الشكل(42): عمل الحفر في الأكار بطريقة الأنتشار المناعي الثنائي .

ب-الانتشـــار المنـــاعي الشـــعاعي المفـــرد Single Radial Immunodiffusion(SRID)

تسمى طريقة الترسيب هنا أيضا بأختبار مانسيني Mancini test ، وهي طريقة كمية Quantitative ولذلك لحساب الكمية يمكن تقدير كمية المستضد او الجسم المضاد ، حيث يوزع الجسم المضاد في الاكار بشكل متساوي بينما يوضع المستضد داخل الحفر والعكس صحيح(شكل43)، بعدها تتكون دائرة من الراسب في منطقة تكافؤ الضد مع المستضد .



الشكل(43): الأنتشار الشعاعي المناعي المنفرد .

المواد المستخدمة:

اطباق جاهزة كل طبق يتكون من 0.1 ± 8 مل من خليط الاكاروز ، المصل الضدي للكلوبيولين عند PH 7.2 مع 0.01% من الصوديوم ازايد. تستخدم هذه الاطباق لقياس تراكيز الكلوبيولينات المناعية IgM، IgG، و IgA بنوعيه IgA1وIgA2 ، وكذلك يتم في هذة الطريقة تقدير مكوني المتمم C3 و C4.

طريقة العمل:

1-نخرج العلب من الثلاجة ونضعها في درجة حرارة الغرفة ثم نخرج الاطباق والمصل القياسي من هذه العلب.

2-نرفع اغطية الاطباق للتأكد من عدم وجود رطوبة.

3-نمزج المصل القياسي وعينات المرضى في عبواتها ثم نأخذ 5 مايكروليتر من المصل القياسي ومن عينات السيطرة والمرضى ونضعها في حفرها الملائمة .

4-يعاد الغطاء الى الاطباق وتحضن في درجة حرارة الغرفة 23±2 او في حاضنة بدرجة حرارة 30م° ولمدة 72 ساعة ، ومن ثم نتابع حدوث الترسيب يوميا".

قراءة النتائج:

يتم تسجيل قراءات الانتشار الشعاعي المنفرد من خلال :

أ-تكون حلقة ترسيب والتي تقاس بواسطة عدسة مدرجة ، حيث توجد جداول مثبتة فيها القطر والتركيز.

ب-حساب التركيز بواسطة مقارنة القطر مع التراكيز القياسية.

تقنية الاليزا ELISA

1-المقدمة :

يعرف هذا الاختبار بالمقايسة الأمتصاصية المناعية للأنزيم المرتبط Enzyme –linked immunosorbent assay (ELISA) ، وهو أختبار كيميائي حيوي يعتمد على أستخدام الأجسام المضادة للكشف عن وجود الببتيدات و البروتينات المختلفة الموجودة في بلازما الدم ، المصل ، اللعاب ، الأدرار وكذلك في الأنسجة مثل المستضدات antigens ، الحركيات الخلوية والهرمونات وغيرها من البروتينات الموجودة في جسم اللبائن من خلال التغيير اللوني في التعرف على تلك البروتينات، ويعتبر جهاز الاليزا من الاجهزة الحديثة المستخدمة في التحليلات المرضية(شكل44) ، حيث استخدم هذا الجهاز لأول مرة من قبل الباحثين Engvall و Perlmann في عام 1971 . يعتمد هذا الفحص على وضع العينة في أطباق خاصة تحتوي على المستضد المحدد المراد الكشف عنه ، فاذا كانت العينة تحتوي على الاجسام المضادة المتخصصة بذلك المستضد فسوف يرتبطان معا" ويحدث تغير لوني ، ومن ثم يتم قياس مقدار التغير الحاصل في اللون ، والذي يعطي بدوره انطباعا" عن كمية الأجسام المضادة مثلا" الموجودة في الجسم .



الشكل(44): جهاز الاليزا .

2-المواد والأدوات المستخدمة في تقنية الاليزا :

تتألف من العديد من المواد وهي :

أ-قارئ الاليزا ELISA Reader

الذي يجب أن يحتوي على مرشح يغطي مابين 450-650 نانوميتر، ماصة Pipette حيث تتوفر بأشكال مختلفة.

ب-العدة الخاصة بالاليزا ELISA kit

حيث تختلف مكونات العدة حسب الشركة المصنعة وأهم مكونات العدة وهي(شكل 45) :

1- الأجسام المضادة أو المستضدات المتخصصة Specific antibodies or antigens .

2- نظام الغسل Washing system

قد يكون هذا النظام أما يدويا" حيث يغسل صفا" أو عمودا" واحدا" في ذات الوقت ، أو نظاما" شبه آلي يغسل شريطا" أو لوحة واحدة في أن واحد ، أو أنظمة آلية بشكل كامل حيث يمكنها غسل ألواح متعددة .

3- ألواح المعايرة : microtiter plates

وهي ألواح من البوليستيرين مكونة من 96 حفرة ، وتكون مغطاة أما بمستضد غير نشط أو جسم مضاد(الشكل46) .

4- الضوابط Controls

تستخدم الضوابط للتأكد من دقة الفحص وكذلك لحساب نتائج العينة ، وهنالك نوعين من الضوابط لكل مجموعة ، وهما الايجابي والسلبي .

5- الخميرة المقترنة Conjugated enzyme

هي عبارة عن أنزيم مرتبط بالأجسام المضادة التي ترتبط بشكل متخصص مع العينة .

6- محلول الغسل Washing solution

هو محلول يستعمل لغسل وازالة المواد غير المرتبطة من اللوحة .

7- محلول وقف التفاعل Stop solution

هو محلول يتم اضافتة لوقف التفاعل وايقاف تغير اللون .



الشكل (45): عدة فحص الاليزا ELISA kit .



الشكل(46): طبق المعايرة الدقيق microtiter plate .

3-خطوات تقنية الاليزا :

أ-التغليف Coating : تغلف الحفر في طبق المعايرة بمحلول الجسم المضاد او المستضد.

ب-الاغلاق Blocking : تغطى جميع الأماكن غير المغلفة في الخطوة الأولى

بمحلول بروتيني يختلف تماما" عن البروتين في خطوة التغليف(الجسم المضاد أو المستضـــد)، وغالبـــا" مايســـتعمل محلـــول دارئ الفوســـفات المتعـــادل phosphate buffer solution .

ت-الكشف Detection :اضافة المستضد أو الضد االنوعي المرتبط بالأنزيم ، حيث يرتبط مع الجسم المضاد أو المستضد المستهدف .

ث-قراءة النتـائج Read results : تضـاف المـادة الأسـاس substrate التـي يعمـل عليهـا الأنـزيم ، وتقـاس الأشـارة(تغيـر لوني)الناتجـة عـن تفاعـل الأنـزيم مـع المـادة الأسـاس أذا كانـت النتيجـة موجبـة، حيث تقـاس أمتصاصـية الضوء النافذ من خلال المحلول بجهاز ELISA reader).

ج-تجري عملية التخلص من المحلول الزائد والغسل بعد كل خطوة من الخطوات أعلاه .

4-أنواع تقنية الأليزا Types of ELISA Technique

أ-فحص الاليزا المباشر Direct ELISA

يغلـف الطبـق بالمستضـد المـراد تشخيصـة ، ثـم يضـاف الجسـم المضـاد المـرتبط بالأنزيم primary conjugated antibody مباشرة (شكل47).

ب-فحص الاليزا غير المباشر Indirect ELISA

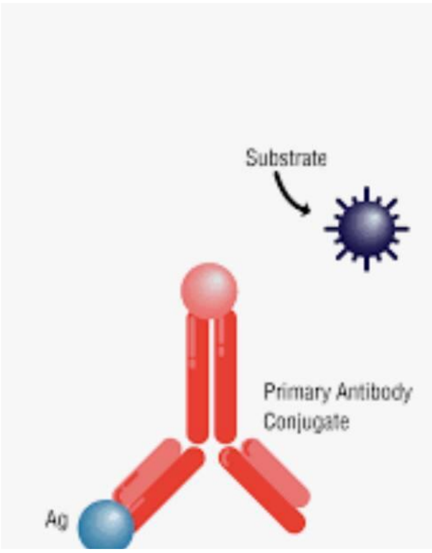
يغلف الطبق بالمستضد المراد تشخيصـة، ثم يضـاف الجسم المضاد الأول غيـر المـرتبط بـالأنزيم primary unconjugated antibody، بعـدها يضـاف الجسم المضـاد الثـاني المرتبط بـالأنزيم secondary conjugated antibody (شكل48).

ت-فحص اليزا الشطيرة Sandwich ELISA

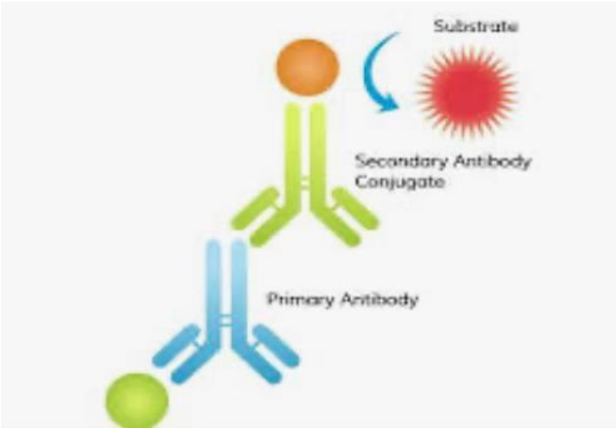
يغلف الطبق بجسم مضاد غير مرتبط بالأنزيم يسمى capture antibody ، بعدها يضاف المستضد المراد تشخيصة ، ثم يضاف الجسم المضاد المرتبط بالأنزيم الذي يسمى antibody detection(شكل 49) .

ث-فحص الاليزا التنافسي Competitive ELISA

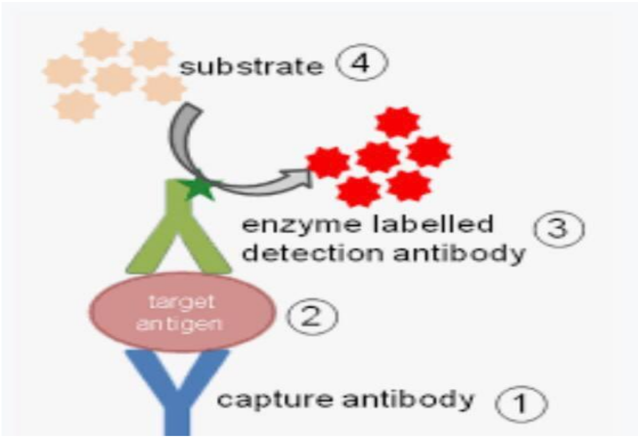
يتم في هذا الأختبار تنافس المستضد المطلوب قياسة مع المستضد المعلم المسمى labeled antigen للأرتباط مع الجسم المضاد ، ويستخدم هذا الاختبار بشكل عام للكشف عن مستضدات الجزيئات الصغيرة ، حيث يفتقر هذا المستضد الصغير الى موقعين أو أكثر ولذلك لايمكن أن يرتبط بجسمين مضادين في نفس الوقت.ان الحدث الرئيسي في هذا الاختبار هو حدوث عملية التفاعل التنافسي بين مستضد العينة والمستضد المرتبط بحفر لوحة المعايره الدقيقة micotiter مع الجسم المضاد الأولي(شكل50) .



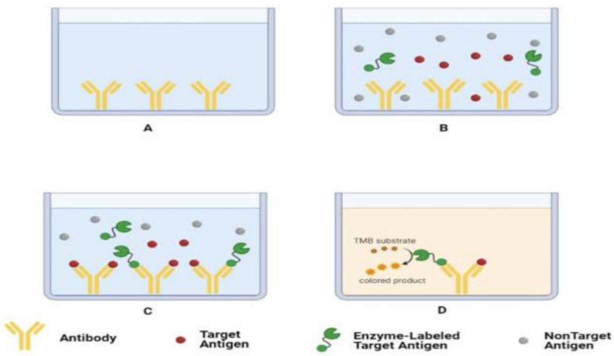
الشكل(47): تقنية الاليزا المباشرة Direct ELISA.



الشكل(48): تقنية الاليزا غير المباشرة Indirect ELISA .



الشكل(49): تقنية اليزا الشطيرة Sandwich ELISA.



الشكل(50): تقنية الأليزا التنافسية Competitive ELISA .

5-حساب النتائج:

يجب أن يحضر محلول قياسي بتراكيز مختلفة معلومة وتقاس الأمتصاصية لكل تركيز من التراكيز ، وتستعمل هذة المعلومات في رسم المنحني القياسي Standard curve ، بعد ذلك تقاس الأمتصاصية للمادة المراد الكشف عنها وتثبت قيمتها على المحور الصادي ، ومن ثم يرسم خط يمتد الى المنحني القياسي ، وبعدها يرسم خط أخر من المنحنى القياسي الى المحور السيني ويستخرج التركيز المجهول .

6-مميزات تقنية الاليزا :

أولا" - الايجابيات :

1-حساسية الفحص و دقتة العالية، حيث تعمل تلك التقنية على أكتشاف المستضدات حتى وان كانت بكميات قليلة جدا"، حيث يتراوح نطاق الكشف النموذجي لهذة التقنية من 0.01 – 0.1 نانوغرام .

2-سهولة الاستخدام :ان خطوات تلك التقنية سهلة ، وكذلك امكانية متابعة أنواع مختلفة من العينات ، مثل مصل الدم ، البلازما ،اللعاب ،الأنسجة و الأدرار .

ثانيا" – السلبيات :

1- تعطي قراءات محددة خلال فترة زمنية وذلك لانه يعتمد على تفاعلات الأنزيم وبالتالي يجب الحصول على النتائج والقراءات خلال فترة زمنية قصيرة .

2- يعطي معلومات محدودة عن المستضد أو العامل المسبب للمرض ، فهو يكشف فقط عن وجوده أو كميته في العينة.

7–دواعي استخدام تقنية الاليزا :

هنالك العديد من الأمراض التي يمكن تشخيصها بأستخدام هذة التقنية منها :

1- فايروس نقص المناعة البشري ، حيث يتم الكشف عن الأجسام المضادة التي ينتجها جسم الشخص المصاب .

2- مرض السفلس Syphilis disease الذي يعتبر من الأمراض الزهرية التي تسببها بكتريا اللولبية الشاحبة *Treponema pallidum* والذي ينتقل عن طريق الأتصال الجنسي بشخص مصاب بتلك البكتريا .

3- سرطان الخلايا الحرشفية Squamous cell carcinoma والذي يعتبر من أكثر السرطانات شيوعا" في الجلد ، اذ يصيب الأنسجة الظهارية الموجودة تحت الجلد وكذلك في الجهاز الهضمي والأعضاء الاخرى .

4- داء المقوسات Toxoplasmosis : ينتج هذا المرض بسبب الأصابة بالطفيلي *Toxoplasma gondii* والذي يسبب الحمى ، انتفاخ العقد اللمفية وظهور طفح جلدي وكدمات تحت الجلد وفقر الدم.

5- فايروس جدري الماء Chicken pox : الذي ينتشر بسرعة وسهولة من الأشخاص المصابين ، ويسبب طفح جلدي من البقع الحمراء المسببة للحكة والتي تتحول الى بثور مملوءة بالسوائل ، وغالبا" ماتظهر على الوجة ، الساقين ، الأذن ، فروة الرأس ، الذراعين ، الصدر والبطن .

اختبار التألق المناعي Immunofluorescence Assay

1- الهدف :

من الممكن ملاحظة تفاعل المستضدات النوعية أو المتخصصة عند معاملتها مع الكلوبيولين-كاما المصبوغ بأصباغ ذات لمعان خاص وتعريضها للأشعة فوق البنفسجية.

2-المواد المطلوبة في هذا الاختبار :

أ-معلق الجرثومة المراد الكشف عنها في المحلول الملحي الطبيعي.

ب-كحول أثيلي بتركيز 95%.

ت-محلول فوسفاتي .

ث-المحلول الملحي لكلوريد الصوديوم بتركيز 0.85%.

ج-مصل يحتوي على الأجسام المضادة للجرثومة المراد أختبارها .

ح-محلول الكلسيرين(9 أجزاء + جزء من محلول البوريت) ذات أس هيدروجيني 7.4 .

خ-مصل طبيعي .

ع-محلول كبريتات الأمونيوم المشبع.

غ-محلول الصبغة بتركيز 0.1% من صبغة التألق fluorescence في محلول الكاربونات-بيكاربونات.

3-طرائق العمل :

تحضير المحلول الفوسفاتي :

أ-فوسفات ثنائية الصوديوم الحامضية بتركيز 1.4غم/100 مل.

ب-فوسفات أحادية الصوديوم بتركيز1.4غم/100 مل.

حيث يتم أضافة 1.84 مل من محلول أ الى 15.9مل من محلول ب ، ثم أضف 8.5 غم من كلوريد الصوديوم الى المزيج وأكمل الى 1000 مل من الماء المقطر.

تحضير محلول الكاربونات :

أ-كاربونات الصوديوم بتركيز 5.3 غم/100 مل.

ب-بيكاربونات الصوديوم بتركيز 2.4 غم/100 مل.

أضف 1.4 من محلول أ الى 98.6 مل من المحلول ب .

طريقة عمل أختبار التألق المناعي :

1-ضع عالق الجراثيم على شريحة زجاجية ومن ثم جففه في الهواء.

2-ثبت الشريحة باستعمال كحول اثيلي بتركيز95% لمدة دقيقة واحدة.

3-أغمس الشريحة في محلول الفوسفات ومن ثم جففها.

4-غط الشريحة بالمصل الحاوي على الأضداد ثم ضعها في طبق يحتوي على قطنة مبلله لمدة 30-60 دقيقة.

5-أغسل الشريحة بمحلول الفوسفات لمدة 10 دقائق.

6-غط الشريحة بالكلوبيولين -كاما المصبوغ ، ثم ضعها في طبق يحتوي على قطنة مبلله لمدة 15 دقيقة.

7-أغسل الشريحة بمحلول الفوسفات لمدة 10 دقائق.

8-غط الشريحة بمحلول الكليسيرين.

9-أفحص بالمجهر الخاص (شكل 51).



الشكل (51): المجهر التألقي المستخدم في التطبيقات الطبية.

طريقة تحضير الكلوبيولين-كاما المصبوغ:

1-ضع 5 مل من الكلوبيولين-كاما في انبوبة طرد مركزي ، ثم ضعه في مسحوق الثلج واضف الية تدريجيا" محلول كبريتات الامونيوم المشبع مع الهز المستمر في الثلج وذلك لترسيب الكلوبيولين-كاما.

2-اترك المزيج طيلة الليل في الثلج.

3-ضع الأنبوب في جهاز الطرد المركزي بسرعة 3000-4000 دورة/ دقيقة لمدة 20 دقيقة ، بعدها تخلص من الراشح.

4-أضف للراسب 2 مل من الماء المقطر ثم أعمل له عملية ديلزه dialysis ضد محلول الفوسفات بدرجة حرارة 4 مئوية لمدة 48 ساعة.

5-أحسب كمية المذيب الواجب أضافته الى الكلوبيولين-كاما لكي نحصل على تركيز قدرة 10 ملغرام /مل.

6-أضف لكل 3 مل من محلول الكلوبيولين-كاما كمية مقدارها 0.18 مل من

محلول الصبغة.

7-ضع الخليط في مسحوق الثلج لمدة 6 ساعات .

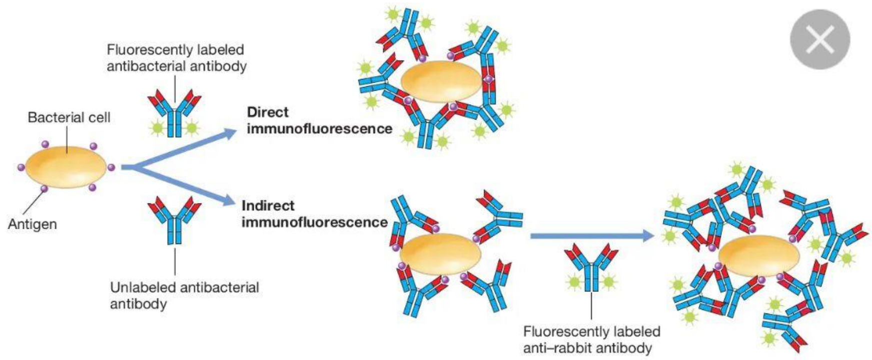
8-يتم عمل تصفية ضد محلول الفوسفات بدرجة حرارة 4 مئوية لمدة 48 ساعة لأزالة الصبغة الغير متحدة.

نتائج الأختبار وتفسيرها:

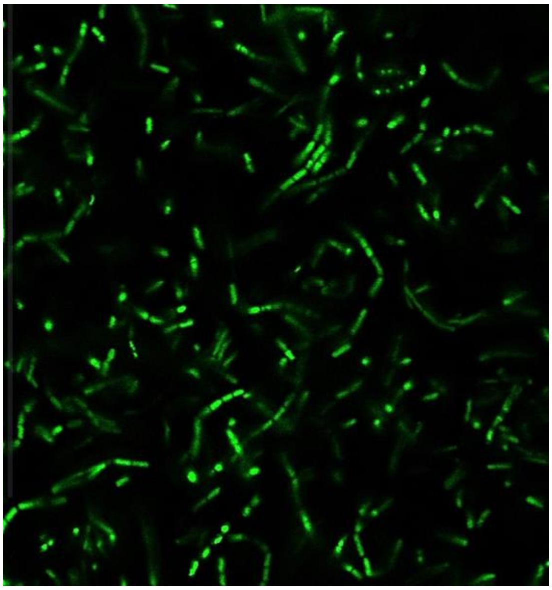
تستخدم اختبارات الأجسام المضادة المتألقة المباشرة antibodies direct fluorescent (DFA) والمسماة بالاجسام المضادة وحيدة النسيلة monoclonal antibodies(mAbs) لربط وأضاءة المستضد الهدف . تعتبر اختبارات DFA مفيدة بشكل خاص للتشخيص السريع للأمراض التي تسببها الجراثيم ، فعلى سبيل المثال يمكن استخدام الاجسام المضادة التي تحمل علامات التألق ضد بكتريا المكورات السبحية القيحية *Streptococcus pyogenes* (المجموعة A strep) للحصول على تشخيص التهاب البلعوم من مسحة الفم ، حيث يكون التشخيص جاهزا" خلال دقائق ، وكذلك يمكن للمريض أن يبدأ بتناول المضادات الحيوية مباشرة بعد الحصول على نتيجة موجبة لهذا الاختبار .ان الاجسام المضادة المتألقة ترتبط مع الجراثيم الموجودة في الشريحة الزجاجية مما يسمح بالكشف الفوري لتك الجراثيم باستخدام مجهر التالق المناعي ، وبالتالي فان تلك التقنية ذات قيمة كبيرة للكشف عن الجراثيم التي يصعب عزلها أو زراعتها من عينات المرضى .

يتمثل مبدأ هذا الاختبار بتحضير أجسام مضادة وحيدة النسيلة معلمة بصبغة التألق(الفلوريسين) والمتخصصة بجرثومة معينة (شكل52)، لذلك

فعندما تضاف تلك الاجسام المضادة المتألقة على الشريحة الزجاجية فسوف ترتبط مباشرة مع المستضدات الموجودة على سطح الجرثومة المراد تشخيصها ، بعد ذلك يتم فحص الشريحة تحت المجهر المتألق والذي هو عبارة عن مجهر يستخدم الفلورة والفسفور لتوليد صورة مشعة للجراثيم ليتم الكشف عنه مباشرة وخلال دقائق معدودة(شكل53).



الشكل(52): المبدأ المناعي لعمل صبغة الفلوريسين .



الشكل (53): الجراثيم المصبوغة بصبغة الفلوريسين .

التشخيص المختبري للاصابة بفايروس العوز المناعي المكتسبAIDS

1-المقدمة :

يعتبـر الفـايروس المسـبب لمتلازمـة العـوز المنـاعي المكتسـب Aquired immune deficiency syndrome(AIDS) مـن الفايروسات المعقدة التي تصيب الخلايا التائية المساعدة CD4 T cells وذلك لانه يختبأ داخل تلك الخلايا عندما تكون في حالة السكون Resting stage مما يؤدي الى توقف نمو وتكاثر الفايروس ، ولكن تلك الفايروسات ربما بعد فترة قد تستمر لسنوات تبدأ بالنشاط من خلال التكاثر والانقسام ومن ثم تكوين الفريون virion النشط والمعدي.

2-تشخيص الأصابة بالفايروس :

هنالك العديد من الأختبارات التي تكشف عن وجود هذا الفايروس منها الفحص الايجابي لوجود الأجسام المضادة المتخصصة بالفايروس ، مستضدات الفايروس أو المادة الوراثية لـه(DNA أوRNA)، ومن هذة الأختبارات :

1- اختبار الحامض النووي Nucleic acid test(NAT)

يستخدم هذا الأختبار في الكشف عن الأصابة بفيروس نقص المناعة البشري HIV أو لتحديد نسبة وجود الفيروس في الدم من خلال قياس تركيز المادة الوراثية RNA الخاصة بالفايروس، ويتميز هذا الأختبار بقدرته على كشف الاصابة بالفايروس في وقت مبكر جدا" ، الا انه مكلف بشكل كبير ولا يستخدم الا في حالات محددة مثل التعرض المحتمل للفايروس مع ظهور الأعراض

المبكرة للأصابة به .

2- أختبار الكشف عن وجود الجسم المضاد أو المستضد

ان هذا الفحص شائع الأستخدام من خلال الكشف عن كلا" من المستضد الفيروسي والجسم المضاد المتخصص به في عينة دم مسحوبة من الشخص المراد الكشف عن أحتمالية اصابته بهذا الفيروس ، ولذلك في حالة الأصابة فان انتاج المستضدات المتخصصة بالفايروس مثل P24 سوف تبدأ بالظهور قبل الأجسام المضادة .

3- اختبار الأجسام المضادة المتخصصة بالفايروس

يعتبر من أسرع الأختبارات في الكشف عن الأجسام المضادة عند الأصابة بهذا الفايروس ، ويتم ذلك عن طريق أخذ عينة دم من الوريد أو عينة من السائل الفموي ، الا ان عينة الدم الوريدية تعطي نتائجها في وقت أقل بعد الأصابة بالفايروس (شكل54).



الشكل(54): الكشف السريع عن الأصابة بفايروس نقص المناعة المكتسب البشري .

3-العوامل التي تزيد من احتمالية الأصابة بفايروس العوز المناعي المكتسب :

أ-تعاطي الأدوية عبر الوريد مثل الستيرويدات والهرمونات وغيرها باستخدام محاقن طبية ملوثة أو معاد استخدامها .

ب-الأصابة ببعض الأخماج مثل بكتريا التدرن *Mycobacterium tuberculosis* أو أحد الأمراض المنقولة جنسيا" مثل التهاب الكبد الفايروسي Hepatitis أو مرض السفلس الزهري الذي تسببة بكتريا *Treponema pallidum* .

4-تفسير نتائج الكشف عن الاصابة بفايروس العوز المناعي البشري HIV :

عند اجراء الاختبار لأول مرة يفضل أن يكون من نوع المستضد/ الجسم المضاد المتخصص بالفايروس ، ففي حالة كون نتيجة الاختبار ايجابية فان الاختبار الثاني يكون اختبار الكشف عن الاجسام المضادة للفايروس الذي يمكن أن يفرق بين النوعين الأكثر شيوعا" من الفايروس وهما النوعين الاول HIV1 والثاني HIV2 ، وتجدر الاشارة الى ان اختبار وجود الاجسام المضادة يحتاج الى مرور ثلاثة أسابيع من الاصابة على الاقل للكشف عنها بشكل دقيق .

تشخيص أمراض العوز المناعي

Diagnosis of immunodeficiency diseases

1- المقدمة :

يشير مصطلح العوز المناعي الى وجود خلل في الجهاز المناعي ، مما يتسبب في عدوى متكررة تكون أكثر حدة واطول من المعتاد ، لذلك تلعب الفحوصات المختبرية دورا" مهما" في تقييم حالة الجهاز المناعي والتي تكون مرتبطة مع معرفة التأريخ الطبي الدقيق و التأريخ العائلي ، ومن ثم اختيار الفحوصات المختبرية المناسبة وتقييم نتائجها . هنالك بعض الفحوصات المختبرية المستخدمة في تشخيص أمراض العوز المناعي منها :

أ-اختبارات الحامض النووي Nucleic acid tests

يستخدم هذا الفحص في الكشف عن فايروس العوز المناعي البشري بعد 10-33 يوما" من التعرض له ، ولكنه لايستخدم عادة لانه باهض الثمن الا في حالة الشك بوجود الاصابة بهذا الفيروس أو في حالة زيادة خطورة التعرض له .

ب-فحوصات المستضدات / الأجسام المضادة Antigens / antibodies tests

يقصد هنا بالمستضدات هي تلك الناتجة عن الاصابة بفايروس العوز المناعي ، أما الأجسام المضادة فهي تنتج من قبل الحهاز المناعي كرد فعل عند التعرض لتلك المستضدات ، ولذلك هذا الأختبار اذا كشف عن وجود هذة المستضدات و أضدادها فهذا يعني وجود اصابة بهذا الفايروس . يمكن لهذا الاختبار الكشف عن الفايروس بعد 18-90 يوما" من التعرض له ، كذلك

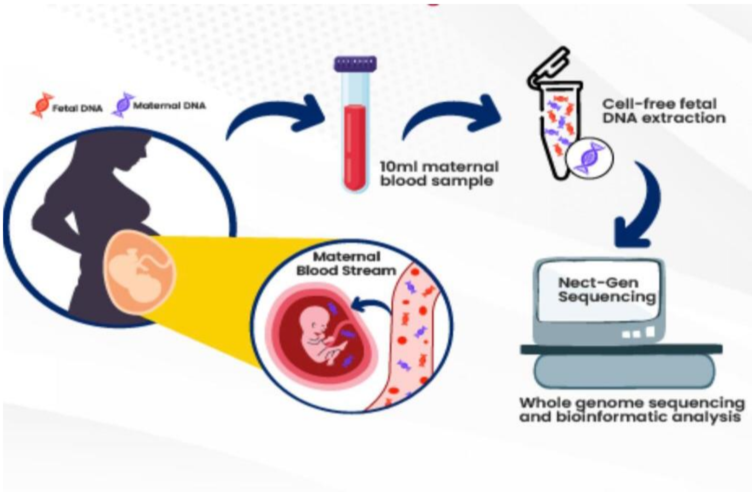
يمكن الكشف عن الأجسام المضادة المتخصصة بالفايروس بعد 23-90 يوما" من التعرض لـه ، حيث يكشف عن تلك الأجسام المضادة في الدم أو السائل الفموي ، ويعتبر ذلك الفحص هو الأسرع في الحصول على النتيجة .

ت- فحص صورة الدم الكاملة Complete blood count (CBC) test

يقيس هذا الفحص عدد خلايا الدم وبضمنها خلايا الجهاز المناعي ، وذلك بأخذ عينة من دم المريض وتحليلها لمعرفة العدد الاجمالي لخلايا الدم البيض ونسبتها المئوية ، حيث تشير الاعداد غير الطبيعية لبعض انواع الخلايا الى وجود خلل ما في الجهاز المناعي .

ث-فحص ما قبل الولادة للجنين (Non-invasive prenatal testing (NIPT

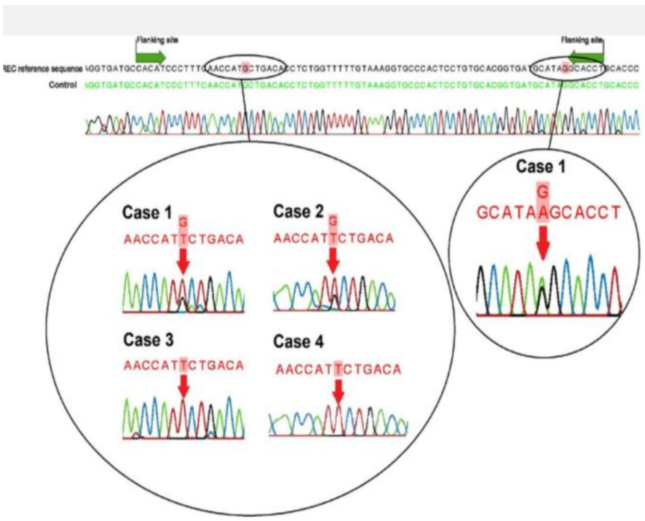
هنالك بعض الأباء قد يرغبون باجراء فحص ماقبل الولادة لأطفالهم الذين يعانون من أحد أمراض العوز المناعي للكشف عن أحتمالية ظهور هذة الامراض في الحمل الجديد ، حيث يتم في هذا الفحص أخذ عينة من السائل الأمنيوني للجنين أو الدم أو حتى الأنسجة المكونة للسخد placenta ويتم من خلالها البحث عن أي تشوهات ان وجدت ، كما قد يتم اجراء فحوصات جينية عن طريق فحص عينات الدم لأفراد تحمل أسرهم جينا" له علاقة باضطراب العوز المناعي الوراثي ، وهل هذا الجين يؤثر على فرصة انجابهم لأطفال مصابين. ان هذا الأختبار هو غير جراحي ، حيث يتم سحب عينة دم من المرأة الحامل للكشف عن التشوهات الكروموسومية في المادة الوراثية للجنين fetal DNA وخاصة الزوج الكروموسومي 21 ، الزوج 13، والزوج 18 ، بما في ذلك الكروموسومات الجنسية للجنين عند الاسبوع 11 من الحمل (شكل55).



الشكل(55): الفحص الوراثي للجنين قبل الولادة NIPT .

ج-اختبار حلقات استئصال مستقبلات الخلايا التائية الوراثي T-cell receptor excision circles(TREC) :

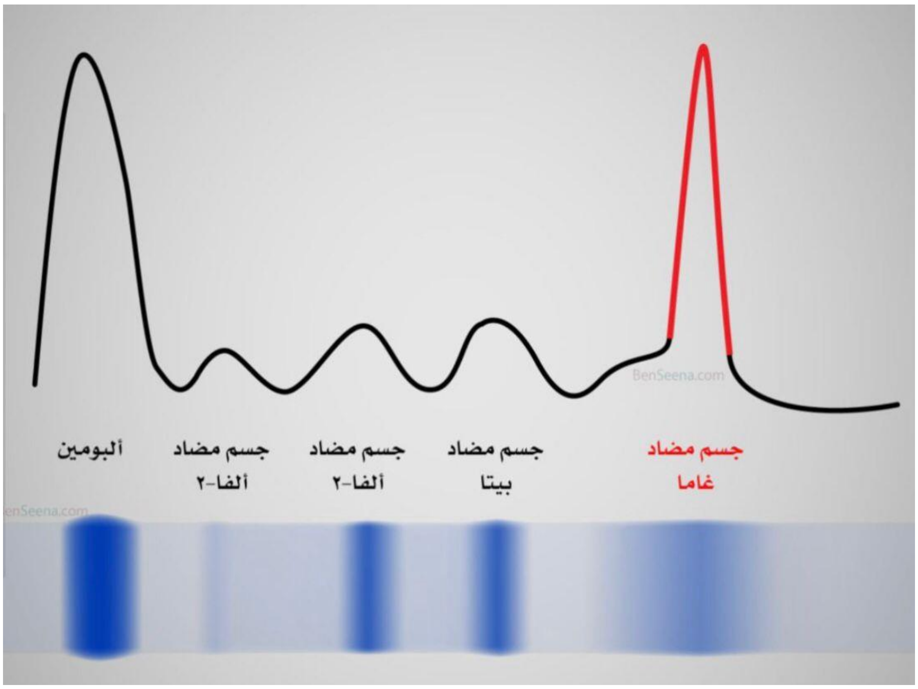
يتم في هذا الأختبار الكشف عن وجود خلايا تائية غير طبيعية للأطفال حديثي الولادة في وقت مبكر وذلك لتجنب وفاتهم في سن مبكرة (شكل56).



الشكل(56): أختبار حلقات أستئصال مستقبلات الخلايا التائية الوراثي TREC .

ح-اختبار الكلوبيولين المناعي في الدم Immunoglobulin blood test

يقدر هذا الاختبار كمية الكلوبيولين المناعي اللي يعرف باسم الأجسام المضادة في الدم ، حيث تنتج تلك الأضداد كرد فعل لدخول الفايروسات وبقية الجراثيم الى الجسم . لقد أشارت الدراسات الى ان الارتفاع الكبير أو الانخفاض الكبير في مستويات تلك الكلوبيولينات المناعية(خاصة IgG ، IgA و IgM) تشير الى وجود مشاكل صحية خطيرة ، حيث ان لهذا الاختبار أهمية كبيرة من خلال معرفة اذا كان الفرد مصاب باضطراب المناعة ، وخاصة اذا كان مصاب بعدوى متكررة وهذا يدل على وجود خلل في الجهاز المناعي ، وكذلك معرفة هل الشخص مصابا" بعدوى ميكروبية أو مقاوما" لها، وايضا" في الكشف عن العديد من أمراض المناعة الذاتية (شكل57).



الشكل(57):البروتينات المناعية في دم الانسان .

خ-أختبار منظومة المتمم Complement system test

تتكون منظومة المتمم من العديد من البروتينات الموجودة في بلازما الدم ، والتي تلعب دورا" مهما" في الاستجابة المناعية الفطرية والتكيفية ضد الممرضات التي تجتاز الدفاعات الخلوية وتدخل الى المجرى الدموي .يستخدم هذا الفحص في الكشف عن مستويات تلك البروتينات(خاصة المكون C3) من خلال استخدام عدة خاصة (شكل58)، وذلك لأن الافراد الذين يعانون من نقص بتلك البروتينات يكونون عرضة للأصابة ببعض الممرضات وأمراض المناعة الذاتية .



الشكل(58): عدة اختبار منظومة المتمم في الدم .

اختبار معقد التوافق النسيجي

Major histocompatibility complex(MHC) test

1- المقدمة :

ان المركز الجزيئي للجهاز المناعي يتألف من جزيئات معقد التوافق النسجي (MHC) والتي عندما ترتبط مع المستقبلات الغشائية على سطوح خلايا الجهاز المناعي العفوي والتكيفي فانها تسيطر على نشوء وأدامه وتنظيم الاستجابة المناعية الخلوية للخمج والاورام ، وكل انسان يحمل مستضدات توافق نسجي خاصة به ، فلذلك عند نقل عضو أو نسيج من الشخص المانح الى الشخص المستلم فسوف تحدث استجابة مناعية خلوية تؤدي الى رفض العضو أو النسيج المنقول بسبب وجود مستضدات معقد التوافق النسجي على الجزء المنقول، فهي تميز على انها غريبة من قبل الجهاز المناعي للمستلم فلذلك يحدث الرفض . ان هذه المستضدات عبارة عن بروتينات مشتركة مع اغشية خلايا الدم البيض في الانسان، ويكون موقع نواتج التعبير الجيني لجينات متعددة في صنفي معقد التوافق النسيجي في الذراع القصير للكروموسوم السادس للإنسان ، وتعرف هذه المستضدات أيضا" بمستضدات الخلايا البيض للإنسان Human Leucocyte antigen (HLA) لكثرة وجودها على سطوح خلايا الدم البيض، وتقسم الى صنفين وهما MHC Class I و MHC Class II .

2-طريقة اختبار معقد التوافق النسجي بالطرق المصلية:

تستخدم الخلايا المناعية والمتمثلة بالخلايا اللمفاوية في التحري عن

تطابق مستضدات معقد التوافق النسيجي وكما يلي :

أ-يتم خلط الدم الوريدي المحيطي مع Ficoll-Hypaque ومن ثم تطرد مركزيا″ ، بعدها يتم فصل الطبقة المحتوية على خلايا وحيدة النواة الدموية في الدم المحيطي ، و غسلها واستخدامها .

ب- يتم استخدام الخلايا اللمفاوية المعزولة من العقد اللمفاوية و الطحال من الجثث.

ت-توجد HLA للمستضدات من الصنف الثاني مع تجمعات الخلايا البائية ، و حوالي 80% من الخلايا التائية الطبيعية موجودة في الدم المحيطي ،حيث ترتبط الخلايا التائية التي تفتقر الى مستضدات الصنف الثاني على سطحها .

ث- يتم استخدام حبات مغناطيسية مغلفة بأضداد عنقود التمايز الثاني CD2 أو أضداد عنقود التمايز الثالث CD3 لعزل الخلايا التائية، وتستخدم مغناطيسية مغلفة بالاجسام المضادة وحيدة النسيلة (CD19 MABS) monoclonal antibodies لعزل الخلايا البائية.

3-الكشف عن المستضدات HLA من قبل الخلايا اللمفاوية :

أ-فحص السمية الخلوية الصغرى هو اختبار السمية الخلوية الليمفاوية ، حيث أن العينات المجمدة التي تحتوي على المستضدات المغلقة بأجسام مضادة مختلفة ضد المستضدات HLA وهي متوفرة تجاريا″ ،اذ يتم توزيع ما يقارب 2000 خلية لمفاوية في كل حفرة من الشريحة ، ويتم تحضيرها لمدة 30 دقيقة في درجة حرارة الغرفة.ان الأجسام المضادة في كل حفرة ترتبط بمستضدات HLA محددة على سطحوح الخلايا اللمفاوية ان وجدت.

ب-يضاف خمسة ميكرولتر من مكمل المتمم (عادة مصل الأرنب) الى كل حفرة و يحضن لمدة 60 دقيقة ، حيث تحفز بروتينات المتمم على موت الخلايا اللمفاوية المغلقة بالأجسام المضادة وحيدة النسيلة mAbs مع الخلايا الليمفاوية ، ولكن في غياب mAbs مع الخلايا الليمفاوية لا يتم تنشيط المتمم و لذلك لاتقتل الخلايا اللمفاوية.

ت-تضاف صبغة يوسين Y متبوعا بالفورمالدهايد حيث يثبت الفورمالدهيد التفاعل .

ثم يتم حساب الخلايا الميتة و الخلايا الحية في كل حفرة تحت المجهر الصوري وكما يلي :

اولاً- الخلايا المتورمة والمظلمة هي خلايا ميتة ، حيث تدخل صبغة يوسين Y في الخلايا الميتة .

ثانياً- الخلايا الساطعة و المنكسرة هي خلايا حية ، حيث لا تدخل صبغة يوسين Y في الخلايا الحية .

ثم يتم عرض كل حفرة في الدرج بشكل فردي للخلايا الميتة و الخلايا الحية ، بعدها يتم حساب النسبة المئوية للخلايا الميتة و الحية في كل حفرة .

يتم تحديد نوع HLA من خلال تفسير تفاعل الخلايا اللمفاوية للفرد مع أجسام مضادة مختلفة تستخدم في اختبار السمية الخلوية اللمفاوية و كما يلي :

1- من المتوقع ان يكون لكل فرد اثنين من HLA-A ، اثنين من HLA-B و اثنين من مستضدات HLA-C على سطح الخلية اللمفاوية .

2- اذا ظهر ان الفرد يحمل واحدا فقط من المستضدات HLA-A او HLA-B او HLA-C في الاختبار ، فمن المحتمل ان يكون ذلك متماثل الزيجات لهذا المستضد المعين أو لوحة مضادات المصول antisera المستخدمة في الاختبار ، حيث لا تحتوي على الجسم المضاد المحدد ضد المستضد الثاني أو هناك انخفاض في تعبير جزيئات HLA على سطوح الخلايا اللمفاوية .

يتم اجراء اختبار سمية الخلايا اللمفاوية على المستضدات لمستضدات HLA-DR— و HLA-DQ بأستخدام الخلايا البائية المعزولة بواسطة حبات مغناطيسية مغلفة او خلايا بائية معزولة على صوف نايلون .

4-طريقة ELISA للكشف عن الأجسام المضادة الى HLA في المصل :

تكون هذة الطريقة سهلة و سريعة حيث لا تتطلب خلايا لمفية حية و كذلك المتمم ، اذ يتم تلبيس مستضدات HLA المنقاة من التقارب على جدران صفيحة المعايرة الدقيقة microtiter (الشكل59) وكما يلي:

1- يضاف مصل المتلقي و يحضن .

2- بعد الغسيل ، يتم اضافة انزيم مترافق مع ضد للجراثيم البشري و يتم حضانته .

3-بعد الغسل ، يضاف الركيزة و تحضن كالتالي :

اولا″- يشير تغير اللون في حفرة معينة الى وجود الأجسام المضادة IgG ضد مولد HLA المطلي على تلك الحفرة بعينها .

ثانيا″- يشير عدم تغير اللون في حفرة معينة الى عدم وجود الاجسام المضادة لمستضد HLA المحدد المغطى على هذه الحفرة .



الشكل(59): عدة الاليزا للكشف عن الاجسام المضادة الى HLA في المصل .

5-طريقة التدفق الخلوي للكشف عن الأجسام المضادة الى HLA في المصل:

يتم في هذا الاختبار حضن الخرزات المغلفة مع المستضدات HLA مع مصل المريض ثم مع الاجسام المضادة IgG للانفلونزا المسمى fluorescent ، حيث توفر النسبة المئوية للخرز اللطخة فوق الخلفية مقياس الاجسام المضادة التفاعلية في لوحة المريض PRA .

طريقة اختبارالتوافق Cross –match method

اذا احتوى دم المستلم على اجسام مضادة الى المستضدات HLA المانحة ، فان مستضدات HLA الموجودة على الخلايا المانحة سوف تتفاعل مع الاجسام المضادة للمستلم عند الزرع ، لذلك فمن الضروري قبل زراعة الاعضاء معرفة اذا كان لدى المتلقي اضداد ضد مستضدات التوافق النسجي المانحة وذلك لان وجودها يؤدي الى رفض غرس العضو او النسيج .

6-اختبار التطابق بين الخلايا اللمفاوية المانحة والمستلمة :

أ-يتم خلط الخلايا اللمفاوية في الدم للجهة المانحة المقترحة التي تحتوي على 80% من الخلايا التائية و التي تحمل مستضدات الصنف الاول من معقد التوافق النسجي1 MHC class و 20% من الخلايا التائية و الخلايا الوراثية التي تحمل مستضدات الصنف الأول والثاني من معقد التوافق النسجي MHC class 1 and 11 مع مصل المستلم و المحضنة .

ب-تضاف المكملة ويتم حضانتها .

ت-تضاف صبغة يوسين Y و تحضن .

يتم حساب عدد الخلايا الميتة و القابلة للحياة ومن ثم تحسب نسبة الخلايا الميتة. ان وجود 50% او اكثر من الخلايا الميتة بالموت الخلوي المبرمج apoptosis يشير الى تطابق ايجابي قوي، اي ان لدى مصل المتلقي أضداد قادرة على التفاعل مع مستضدات HLA المانحة ،أي ان هناك تطابق ايجابي قوي بين المستلم و المانح المقترح وهو يمثل موانع لزراعة الاعضاء من المتبرع الى المستلم .

لمعرفة ما اذا كانت الاجسام المضادة للمستلم موجهة ضد المستضدات من الصنف الاول أو الثاني من معقد التوافق النسجي ، يتم اجراء التزاوج بواسطة الخلية التائية السامة باستخدام الخلايا التائية المثرية أو مطابقة الخلايا الليمفاوية للخلية الليمفاوية باستخدام الخلايا البائية المثرية على التوالي . ان مقياس التدفق الخلوي عبر القنوات هو اكثر حساسية بمقدار 30-250 مرة من الطرق المصلية البصرية للكشف عن الاجسام

المضادة IgG ضد المستضدات HLA على سطح الخلايا اللمفاوية ، اذ يتم حضانة الخلايا اللمفاوية الطرفية للمتبرع المقترح مع المسمى على سبيل المثال ، صبغة الفلورسنت التي تصدر الضوء الاخضر mAbs anti-CD3 التي ترتبط بالخلايا التائية ، حيث يتم فصل الخلايا الموصولة بعلامة ضد عنقود التمايز الثالث (anti-CD3) من الخلايا التائية في جهاز قياس التدفق الخلوي flow cytometry ، ثم تحضن أنيا" الخلايا التائية المنفصلة و الملونة مع مصل المتلقي المنتظر .

عندها يلاحظ ان الاجسام المضادة المصلية للمستقبل ضد مستضدات معقد التوافق النسجي للخلايا التائية HLA المانحة ان وجدت سوف ترتبط بالخلايا التائية :

1- بعد الغسل ، يتم اضافة flurochrome الذي ينبعث منها لون بخلاف اللون الاخضر ، لون احمر المسمى الذي هو IgG ، و من ثم يحضن .

2- سوف يرتبط ملصق IgG المضاد للبشر المسمى fluore بالاجسام المضادة للمركب HLA الخاصة بالمستقبل ، و التي ترتبط بالخلايا التائية المانحة .

يحسب عداد التدفق الخلوي و عدد الخلايا التائية (اللون الاحمر و الاخضر) و الخلايا التائية (اللون الاخضر) ، ومن ثم يتم تحضير المدرج التكراري .

7-التطابق المتقاطع للأجسام المضادة ضد الخلايا اللمفية :

قد تربط الاجسام المضادة الى الخلايا الليمفاوية في مصل المستلم غير

الخلايا الليمفاوية الخاصة بالمتبرع ، و تعطي نتيجة مطابقة كاذبة ايجابية ، وبالتالي فأن الجهة المانحة تكون غير مؤهلة للتبرع بالأعضاء الى مستلم معين ،حيث يمكن للأجسام المضادة الذاتية ايضا أن تخفي وجود أجسام مضادة معينة ضد المتبرع .

يتم الكشف عن وجود الأجسام المضادة الى الخلايا اللمفية ، والتي يتم الجمع بين الخلايا الليمفاوية و المصل الخاصة بالمستقبل في اختبار السمية الخلوية القياسية . و من ثم يتم اجراء تطابقات الاضداد الذاتية بشكل متزامن مع جميع العينات الحية للمانحين مقابل كل مصل يتم اختباره .

8-طرق البيولوجيا الجزيئية في تشخيص HLA:

ان معظم طرق الطباعة الجزيئية تستخدم تقنية تفاعل البلمرة المتسلسل PCR لتضخيم مقاطع جينات HLA المطلوبة للكتابة بشكل انتقائي وكما يلي :

1- يتم استخراج الحامض النووي للفرد من الخلايا او الانسجة .

2- يضاف الحامض النووي الى الانابيب التي تحتوي على مجموعات من البرايمرات المختلفة لجينات HLA المختلفة .

3- تضمن مجموعة اضافية من الاشكال كتحكم ايجابي في التضخيم في جميع الانابيب .

4-تتم اضافة مكونات اخرى لتفاعل البلمرة المتسلسل (مثل النيوكليوتيدات الدنا ، بوليميراز الدنا ، المخزن المؤقت) و يتم اجراء التدوير الحراري .

5- يتم تكبير منتجات الترحيل الكهربائي في الهلام Agarose Gel Electrophoresis مع بروميد الأيثيديوم و تصويرها تحت ضوء الاشعة

فوق البنفسجية وكما يلي :

اولا″– يشير وجود النطاق الى ان عينة الحامض النووي لها التسلسل المقابل لنوع HLA المعين.

ثانيا″– يشير غياب الفرقة الى ان عينة الحامض النووي لا تحتوي على التسلسل المحدد لنوع HLA .

ثالثا″– يجب ان يكون نطاق التحكم في التضخيم الداخلي موجودا" للتأويل .

الأرجية Allergy

1- المقدمة :

ان المحفزات المستضدية قد تولد نموذجين من الاستجابة المناعية وهما المناعة Immunity و الارجية Allergy ، فالمصطلح الاول يشير الى الاستجابات المناعية المفيدة التي تقود الى الحماية من التحدي الخمجي ، في حين ان المصطلح الثاني يشير الى التفاعل المناعي المؤذي أو المخرب للأنسجة في الحي *in vivo* والذي ينشا من التداخل بين الأستجابة المناعية و المستضد الذي سبق وأن تعرض له الفرد. لقد قسمت فرط الحساسية الى أربعة أنماط اعتمادا" على ألية حدوث الحساسية وكما يلي :

1 – فرط الحساسية الانية

Immediate Hypersensitivity

2 – فرط حساسية الانسمام الخلوي

Cytotoxic Hypersensitivity

3– فرط حساسية المعقد المناعي

Immune Complex Hypersensitivity

4 – فرط الحساسية المتأخرة

Delayed Hypersensitivity

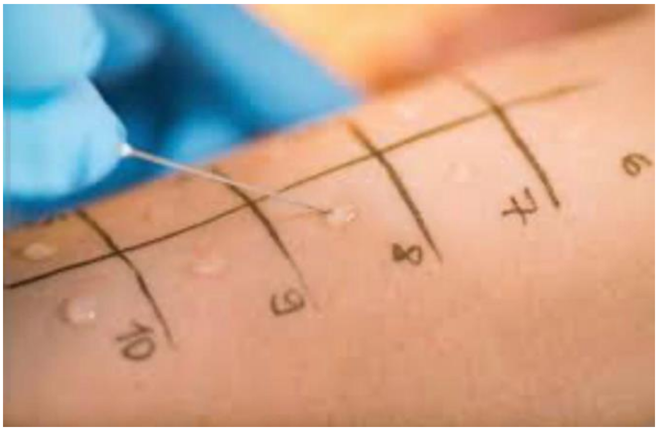
2–أهم اختبارات الحساسية :

أ–اختبار الحساسية العام : يتم اجراء هذا الفحص بالتحري عن الضد IgE، حيث يمكن اجرائه من خلال تقنية الاليزا وهنا يتم التحري عن زيادة تركيز

الضد في مصل الدم .

ب-اختبارات حساسية الجلد وهي :

أولاً- اختبار وخز الجلد Skin prick test : يعد هذا الاختبار مفيدا وغير مكلف ويمتاز بسرعة نتائجه ويستخدم للكشف عن المواد المسببة للحساسية من النمط الاول والتي يتوسطها الضد IgE ، وهذا الاختبار مناسب في حالات الربو ، التهاب الانف التحسسي ، حساسية العين ، حساسية الادوية ، لسعات الحشرات وحساسية الطعام (شكل 60).

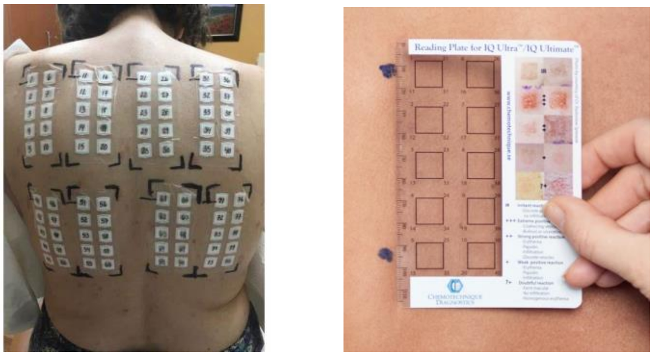


الشكل(60): اختبار وخز الجلد للكشف عن الحساسية من النمط الأول .

تعطي اختبارات وخز الجلد نتيجة موثوقة في تحديد سبب الاصابة بامراض الحساسية ومع ذلك يجب التأكيد على التشخيص السريري للحساسية لان النتيجة الايجابية في اختبار الحساسية قد لاتكون دائماً سبباً لامراض الحساسية ويجب تحديد المسبب الدقيق للحساسية وتجنب هذه المواد وعند اجراء اختبار الحساسية يجب عدم تناول الادوية التي قد تؤثر على نتيجة الاختبار.

ثانيا"- اختبار البقعة Patch test

يستخدم هذا النوع من الفحوصات في التحري عن تفاعلات فرط الحساسية المتاخرة المتوسطة بالخلايا التائية وغالبا ما تستخدم في تشخيص الحساسية التلامسية Contact allergy الشكلين (61) و (62).



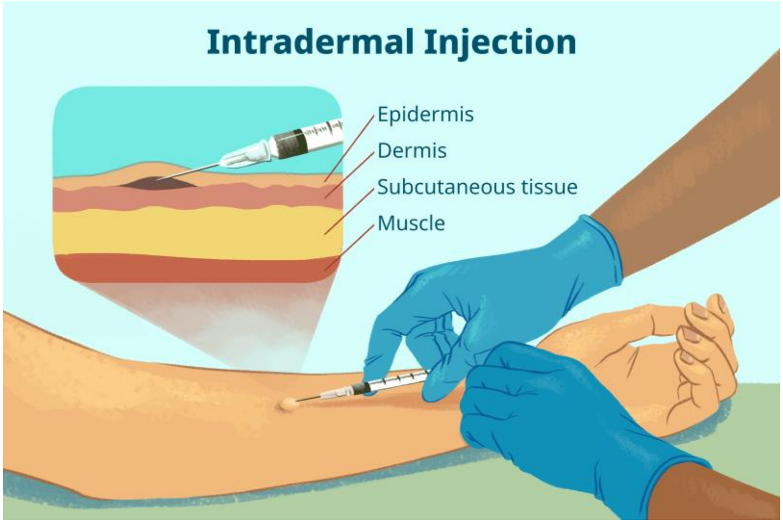
الشكل(61): اختبار بقعة الجلد للكشف عن نمط فرط الحساسية المتأخرة .



الشكل(62): التفاعلات الموجبة الى اختبار البقعة .

ثالثاً- اختبار الحساسية في الأدمة Intradermal allergy test

يمكن استخدام هذا الاختبار لتقييم كل من الحساسية الانية وفرط الحساسية المتاخرة من خلال وقت القراءة (شكل63).



الشكل(63): اختبار الحساسية في الأدمة .

رابعاً-اختبار التيبوبركلين Tuberculin test

هو عبارة عن اختبار يستخدم للكشف عن فرط الحساسية المتأخرة ، ويتم عن طريق حقن الجسم بمستضد من نوع معين سبق للجسم ان تعامل او تعرض له ، أما عن طريق الاصابة السابقة بالتدرن الرئوي أو تعامل بصورة غير مباشرة مع اعداد قليلة من عصيات السل *Mycobacterium tuberculosis* والتي لم تسبب عنده التدرن بل حسست فقط قسم من الخلايا التائية T cells .

<u>انواع التيوبركيولين :</u>

1- النوع القديم Old tuberculin:

يوجد هذا النوع على شكل مستخلص من الراشح النامية فيه عصيات كوخ .

2- مشتقات البروتين النقية Purified protein deridative(PPD)

هو من مشتقات البروتين الموجودة في عصيات السل ، و تقاس بما يسمى وحدة التيوبركيولين Tuberculin unit TU والتي تعادل 0.00002 ملغم /بروتين لكل حقنة .

طريقة العمل :

1- عقم الجهة القابضة او المثنية flexor من الساعد fore arm بالكحول الأثيلي بنسبة 70% .

2- احقن 1% مللتر من محلول التيوبركيولين الذي يحتوي على خمس وحدات 5units داخل الجلد في الجهة المثنية من الساعد .

3- ارسم دائرة بقلم التلوين حول نقطة الحقن .

4- راقب النتيجة بعد مرور 48-72 ساعة ، ثم احسب قطر منطقة الاحمرار حول نقطة الحقن بواسطة المسطرة (شكل 64).



الشكل(64): اختبار التيوبركلين الجلدي في الأنسان .

<u>المحاليل المستخدمة في اختبارات الحساسية :</u>

تختلف المحاليل المستخدمة في اختبارات الحساسية حسب نوع الحساسية

و المكان الذي يعيشون فيه ،حيث تتكون محاليل اختبار الحساسية من خليط من مسببات الحساسية / بروتينات ، بروتينات سكرية ، عديدات السكريد / و مكونات غير مسببة للحساسية /دهون، املاح ، اصباغ و مستقبلات التي يتم الحصول عليها من مصدر الحساسية ، و لذلك تتكون مستخلصات الخام من محسسات اصلية و بروتينات تفاعلية . ان المواد المسببة للحساسية بشكل عام عبارة عن بروتينات و بروتينات سكرية بشكل اساسي ، ولكن الكربوهيدرات أو غيرها من المواد الكيميائية منخفضة الوزن الجزيئي يمكن ان تسبب حساسية عند تحويلها الى مستضدات كاملة من خلال مزجها مع حامل بروتيني Carrier protein .

اختبار الحساسية في الحيوان المختبري :

يسمى هذا الاختبار بالتأق anaphylaxis ، حيث يتم اجراءة في الحيوانات المختبرية كالارنب ،خنازير غينيا وغيرها . وكما يلي :

1- خذ حيوانين مثل الارنب واحقن كل منهما 0.1 مل بمحلول الالبومين البقري (بتركيز 1%) تحت الجلد والبريتون ويتم التجريع لمدة شهر كامل بعدها يتم اجراء فحص الجلد.

2- تتم حلاقة الشعر الموجود على الجلد وبدون جرح الجلد.

3- تستخدم محقنة بحجم 1 مل ، حيث يحقن 0.1 مل محلول الالبومين البقري في احد الحيوانين وحقن 0.1 مل من المحلول الملحي في الحيوان الاخر اذ يعتبر كسيطرة .

4- يتم الحقن بين طبقات الجلد وتقرا نتيجة الاختبار بعد مرور 4 ساعات ، 24 ساعة وبعد 48 ساعة وتكون النتيجة الموجبة متمثلة بظهور انتفاخ واحمرار ، حيث يتم قياس قطر الاحمرار(مايكرون)ويقارن مع حيوان السيطرة .

أمراض المناعة الذاتية Autoimmune diseases

1- المقدمة :

أن المناعة ضد الذات هي معقدة ، ويعتقد أنها تنشأ بواسطة أليات مختلفة وأن خطورتها هو تأثرها بمختلف العوامل البيئية والوراثية ، وتساهم تلك العوامل في تحطم التحمل الذاتي Self- tolerance أذ يعرف التحمل tolerance بقابلية الجهاز المناعي في التمييز بشكل فاعل بين الذات والغريب من المستضدات ولذلك لا تحدث مهاجمة للذات . يوجد اكثر من 100 مرض مناعي ذاتي منها ألتهاب المفاصل الرثواني Rheumatoid arthritis ، النوع الاول من داء السكري Diabetes mellitus ، داء الصدفية Psoriasis وداء الذؤاب الأحمراري الجهازي Systemic lupus erythematosus وغيرها من أمراض المناعة الذاتية .

أ- التهاب المفاصل الرثواني Rheumatoid arthritis

يتم الكشف عن هذا المرض من خلال اختبار العامل الرثواني Rheumatoid factor test (شكل 65). ان هذ الاختبار متوفر ويستخدم بشكل روتيني في المستشفيات وهو عبارة عن جزيئات اللاتكس وتكون طريقة العمل كالاتي :

1- يتم اخذ 2 مل من اللاتكس ويضاف اليه 20 مل من الماء المقطر المعقم ويمزج جيدا بالرج .

2- خذ 3 انابيب بسعة 3× 0.5انج واضف لها 1 مل من محلول دارىء البوريت الى كل انبوبة .

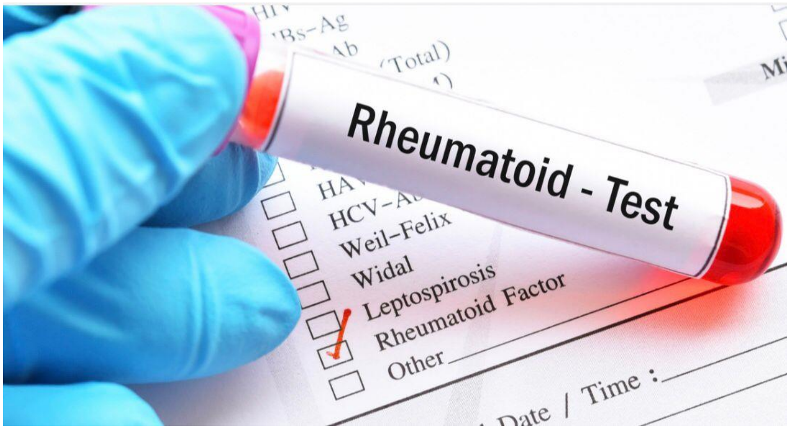
3- خذ عينة مصل المريض وضعها في حمام مائي لمدة 30 دقيقة وبدرجة حرارة 56 م للتخلص من بروتينات المتمم .

4- اضف 0.05 مل من المصل المزال منه المتمم الى احد الانابيب الثلاثة .

5- ضع في الأنبوبة الثانية سيطرة موجبة (موجودة بعدة الفحص)والأنبوبة الثالثة السيطرة السالبة .

6- يضاف 1 مل من اللاتكس الى الانابيب الثلاثة وبعدها نرج الانابيب ونضعها في حمام مائي بدرجة 56 لمدة ساعتين ، بعدها ضع الانابيب في جهاز الطرد المركزي بسرعة 1000 دورة /دقيقة لمدة ثلاثة دقائق .

7-تقرا النتيجة من خلال تكوين راشح صافي مع راسب حبيبي والذي يمثل النتيجة الموجبة .



الشكل(65): عدة الكشف عن العامل الرثواني .

ب- داء الزلاق Celiac disease

يسمى هذا المرض ايضا بمتلازمة أرجية الكلوتين

gluten sensitive enteropathy ، وهو عدم التحمل الوراثي للفرد

الى بروتين الكلوتين الموجود في الحنطة والشعير ، حيث يسبب تغيرات مميزة فـــي بطانـــة الامعـــاء الدقيقـــة ، ممـــا يـــؤدي الـــى ســـوء الأمتصـــاص Malabsorption ، وهـذا المـرض يـؤدي الـى ضـمور الزغابـات الجزئـي أو الكامل Total or partial villus atrophy اذا لم يمتنـع المريض من تناول الاغذية الحاوية على ذلك البروتين .

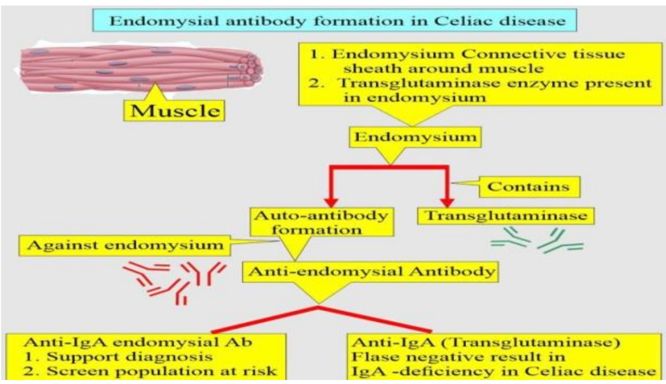
التشخيص المختبري لداء الزلاق Celiac disease:

توجد اربعة تحاليل مصلية لتشخيص هذا المرض وهي :

1- التحري عن الاجسام المضادة لمادة كليادين Anti-gliadin antibody ، ويعد هذا الاختبار من الفحوصات غير النوعية وذلك لانه تم العثور على هذه الاجسام المضادة حتى في الاشخاص الاصحاء وحالات مرضية اخرى كالتهاب الامعاء ومتلازمة الامعاء المتهيجة ، أما في الاطفال دون سن 2 سنة فيعد هذا الاختبار متخصص ويوجد هذا الفحص بعدة اشكال ولكن اكثرها دقة هي تقنية الاليزا .

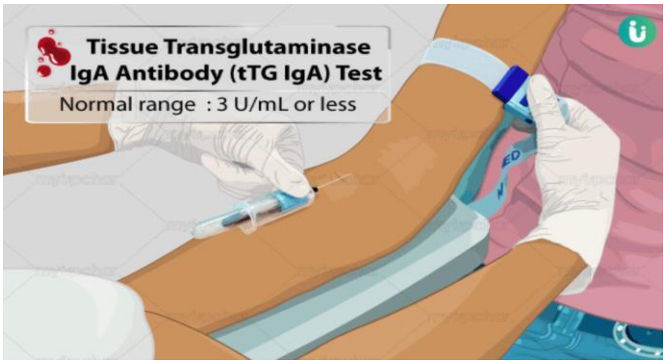
2-التحري عن الاجسام المضادة لغمد الليف العضلي Anti- endomysial antibodies

يعتبر هذا الأختبار هو المعتمد علية في التحري عن مرض متلازمة أرجية الكلوتين ، يتم هذا الاختبار بطريقة الفلورسين المناعي غير المباشر باستخدام المقاطع النسيجية اما من مرىء القرد او الحبل السري البشري ويكون التحري هنا عن الضد IgA (شكل66).



الشكل(66): ألية تكوين Anti-endomysial IgA في داء الزلاق .

3- التحري عن الاجسام المضادة للخميرة الناقلة للغلوتاميين Anti-tissue transglutaminase antibodies(tTG-IgA) ، حيث يستخدم هذا الاختبار للتحري عن تحطم النسيج المخاطي ،اذ يقدر مستويات الأجسام المضادة لانزيم Tissue transglutaminase(tTG) النسيجي في الدم ، فاذا كان الجهاز المناعي يهاجم بطانة المعي بسبب تناول الحنطة والشعير الحاوية على بروتين الكلوتين ، فسوف تظهر مستويات عالية من هذة الأجسام المضادة(tTG-IgA) في الدم ، ولهذا يعتبر هذا الاختبار نوعي في تشخيص هذا المرض (الشكل67).



الشكل(67): أختبار Tissue transglutaminase IgA antibody

4-الاختبارات الوراثية Genetic tests للمرض والتي تتم من خلال التحري عن الاليلات الخاصة بمستضدات معقد التوافق النسجي باستخدام عدة خاصة (الشكل 68) ، حيث ان نسبة 95% من الاشخاص المصابين يكونون حاملين للأليلين HLA-DQ2 و HLA-DQ8 .



الشكل(68): العدة الوراثية للتحري عن الاصابة بداء الزلاق Celiac disease .

References:

AL-Hebouri, M.M.(2024).Clinical Immunology and Allergy .College of Medicine , University of Tikrit .

Hay , F.C., and Westwood , O.M.R.(2002).Practical Immunology .4th edn.,London. Blackwell Sience .

Kohl, T. O. and Ascoli, C. A.(2017). Indirect Immunometric ELISA. Cold Spring Harb Protoc. 01;2017(5).

Konstantinou, G. N. (2017). Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). Meth. Mol. Biol., 1592:79-94.

Premalatha, B. R.; Roopa , S.R., and Vijaya , M. (2011). Immunofluorescence in Oral Pathology: Part I-Methodology. World J Dent., 2: 326-333.

Rosales, C. and Uribe-Querol, E. (2017). Phagocytosis: A Fundamental Process in Immunity. Bio.Med. Res. Inter., 2017(1): 9042851.

Stevens, C. D. (2010). Clinical Immunology and Serology: A Laboratory perspective, 3ed edn,. USA.

Williams, C. A. and Merrill W. C.(2014). Agglutination, Complement, Neutralization, and Inhibition: Methods in Immunology and Immunochemistry, Vol. 4. Massachusetts, United States: Academic Press, Print.

المراجع العربية:

- شناوة، ابراهيم محمد سعيد.(2014).الاصول التجريبية لعلم المناعة. جامعة بابل /كلية العلوم /قسم علوم الحياة. الطبعة الاولى. دار الوضاح للنشر المملكة الاردنية الهاشمية-عمان. مكتبة دجلة جمهورية العراق -بغداد

يعتبر علم المناعة من أكثر العلوم شيوعا ً والأكثر بريقا ً مقارنة مع العلوم البيولوجية الأخرى، ونعتقد أن هنالك زيادة كبيرة في عدد العاملين في هذا الحقل خلال العقدين الماضيين أكثر من أيّ تخصص علمي آخر.

إن علم المناعة علم قائم بذاته، و إن المتحمسين للعمل في هذا الحقل من العلوم ، و مؤلفي هذا الكتاب يكون حماسهم موجهًا بشكل أساسي لفهم التطبيقات المناعية في الإنسان ، والتجارب على الحيوانات المختبرية.

إنّ التجارب والاختبارات في هذا الكتاب تقدم لنا فهما ً حقيقيا ً لشكل واستراتيجية عملية الحياة، وبفضل القدرة على التعرف على خلايا الجهاز المناعي ، الجزيئيات، الأضداد، و المستضدات ، فيمكن تطبيق التقنيات الجديدة في علم المناعة ، والذي يعتبر أساسيا ً في حماية جسم الكائن الحيّ وديمومة وظائفه الأساسية.

Isbn:978-9922-4554-8-8
978-9922-4554-8-8

دار الفرات للثقافة والإعلام ـ العراق ـ بابل
بالاشتراك مع دار سما للطباعة والنشر والتوزيع
رقم الإيداع في دار الكتب والوثائق ببغداد (١٣٨٣) لسنة ٢٠٢٥م
ali.abass-5@yahoo.com / ٠٧٧٠٧٢١١٥٧٠
Al-Furat House for Education and Information
Iraq — Babylon